# REINIGUNG UND REGULATION DER α-ISOPROPYLMALAT-SYNTHASE VON MICROCOCCUS DENITRIFICANS

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von
Horst Fischer
aus Wilhelmshaven

Göttingen 1976

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534921_0015

# REINIGUNG UND REGULATION DER α-ISOPROPYLMALAT-SYNTHASE VON MICROCOCCUS DENITRIFICANS

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von
Horst Fischer
aus Wilhelmshaven

Göttingen 1976

Diese Arbeit wurde im
Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen
durchgeführt.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D7

Referent: Prof. Dr. H.G. Schlegel
Korreferent: Prof. Dr. G. Gottschalk

Tag der mündlichen Prüfung: 29. April 1976

Abkürzungen

| | |
|---|---|
| Abs | DL-α-Aminobuttersäure |
| Ac- | Acetyl- |
| AHS- | Acetohydroxysäure- |
| BIS | N,N'-Methylenbisacrylamid |
| CoA-SH | Coenzym A |
| DEAE- | Diäthylaminoäthyl- |
| DTNB | 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoat) |
| E | Enzymeinheiten (µmol/min) |
| $E_{nm}$ | Extinktion |
| EDTA | Äthylendiamintetraacetat |
| EMS | Äthylmethansulfonat |
| IPM | α-Isopropylmalat |
| KIV | α-Ketoisovalerat |
| MG | Molekulargewicht |
| NADH | Nicotinamid-adenin-dinukleotid (reduziert) |
| NG | 1-Nitroso-3-nitro-1-methylguanidin |
| PALP | Pyridoxal-5-phosphorsäureester |
| TCA | Trichloressigsäure |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |

INHALTSVERZEICHNIS


| | | Seite |
|---|---|---|
| 1. | EINLEITUNG | 1 |
| 2. | METHODEN | 4 |
| 3. | EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE | 29 |
| 3.1 | Bestimmung der Aktivität der α-Isopropylmalat-Synthase | 29 |
| 3.1.1 | Bestimmung der Enzymaktivität durch fluorimetrische Produktbestimmung | 29 |
| 3.1.2 | Bestimmung der Enzymaktivität im optischen Test bei 412 nm | 32 |
| 3.2 | Versuche zur „biologischen Anreicherung" der IPM-Synthase | 33 |
| 3.2.1 | Die spezifische Aktivität der IPM-Synthase in verschiedenen Stadien einer Kultur von Micrococcus denitrificans | 35 |
| 3.2.2 | Die Repression der Enzymbildung | 36 |
| 3.2.3 | Versuche zur Derepression der Enzymbildung | 38 |
| 3.2.3.1 | Wachstum von M. denitrificans und Aktivität der IPM-Synthase bei Anzucht mit 2-Aminobuttersäure | 38 |
| 3.2.3.2 | Die wachstumshemmende Wirkung der leucin-analogen Aminosäuren Trifluorleucin und 4-Azaleucin | 40 |
| 3.3 | Die Aktivität der IPM-Synthase in der für Valin, Isoleucin und Leucin auxotrophen Mutante HF 144 | 42 |
| 3.3.1 | Ausarbeitung einer Methode zur Anreicherung und Isolierung auxotropher Mutanten | 43 |
| 3.3.1.1 | Mutationsauslösung | 43 |
| 3.3.1.2 | Anreicherung von Mutanten | 46 |
| 3.3.1.2.1 | Empfindlichkeit von M. denitrificans gegen Antibiotika | 46 |
| 3.3.1.2.2 | Die Abtötung wachsender Zellen durch Ampicillin | 48 |
| 3.3.1.3 | Anreicherung und Isolierung für die verzweigten Aminosäuren auxotropher Mutanten | 49 |

| | | Seite |
|---|---|---|
| 3.3.1.4 | Charakterisierung der Mutanten | 50 |
| 3.3.2 | Die Aktivität der IPM-Synthase während des Wachstums der Mutante HF 144 unter Mangelbedingungen | 55 |
| 3.4 | Die Anreicherung der IPM-Synthase | 57 |
| 3.4.1 | Anzucht,Lagerung und Aufschluß der Zellen | 57 |
| 3.4.2 | Stabilisierung der IPM-Synthase | 58 |
| 3.4.3 | Versuche zur Fällung der Nucleinsäuren | 59 |
| 3.4.4 | 1. Gelfiltration mit Sephadex G 200 | 60 |
| 3.4.5 | Chromatographie an Sephadex DE - A 50 | 61 |
| 3.4.6 | Chromatographie an DEAE-Cellulose | 62 |
| 3.4.7 | Chromatographie an Hydroxylapatit | 63 |
| 3.4.8 | 2. Gelfiltration mit Sephadex G 200 superfine | 64 |
| 3.5 | Die Regulation der Aktivität der IPM-Synthase | 68 |
| 3.5.1 | Analytische Gelelektrophorese | 68 |
| 3.5.2 | Molekulargewichtsbestimmungen | 71 |
| 3.5.2.1 | Gradientengel-Elektrophorese | 71 |
| 3.5.2.2 | Gelfiltration mit Sephadex G 200 | 76 |
| 3.5.3 | Kältelabilität | 78 |
| 3.5.4 | pH-Optimum | 80 |
| 3.5.5 | Temperaturoptimum | 81 |
| 3.5.6 | Substrat-Geschwindigkeits-Beziehungen | 82 |
| 3.5.6.1 | Bestimmung der Substratsättigung für α-Ketoisovalerat | 82 |
| 3.5.6.2 | Bestimmung der Substratsättigung für Acetyl-CoA | 84 |
| 3.5.6.3 | Substratbindungsstellen | 85 |
| 3.5.7 | Die Inaktivierung der IPM-Synthase durch das Produkt CoA-SH | 86 |
| 3.5.8 | Die unspezifische Reaktion der IPM-Synthase mit α-Ketosäuren und Homologen des Acetyl-CoA | 87 |
| 3.5.9 | Der Einfluß von Aminosäuren und strukturanalogen Verbindungen auf die Aktivität der IPM-Synthase | 89 |

Seite

3.5.9.1 Die Hemmbarkeit der IPM-Synthase durch verschiedene Aminosäuren 89

3.5.9.2 Die Aufhebung der durch Leucin bewirkten Hemmung der IPM-Synthase durch verschiedene Aminosäuren 90

3.5.9.3 Die Abhängigkeit der Hemmung der IPM-Synthase von der Inhibitorkonzentration 93

3.5.9.4 Die Abhängigkeit der Aktivitätshemmung durch L-Leucin von der Substratkonzentration 94

3.5.9.5 Der Einfluß der Effektoren auf die Aktivität der IPM-Synthase in Abhängigkeit vom pH 96

3.5.9.6 Die Abhängigkeit der Substratsättigung der IPM-Synthase von der Inhibitorkonzentration 98

3.5.10 Der Einfluß von Metallionen auf die Aktivität der IPM-Synthase 100

4. DISKUSSION 103

5. ZUSAMMENFASSUNG 120

6. LITERATURVERZEICHNIS 123

# 1. EINLEITUNG

Zur Aufklärung von Stoffwechselwegen in Mikroorganismen haben drei Methoden entscheidend beigetragen: die Herstellung und gezielte Selektion von Mutanten, die Isotopentechnik und die Untersuchungen an gereinigten Enzymen. Durch Aufstellen von Kreuzfütterungsgruppen und Analyse ausgeschiedener Verbindungen von auxotrophen Mutanten konnte auf Zwischenprodukte und beteiligte Enzyme eines Biosyntheseweges geschlossen werden. Der Einsatz radioaktiv markierter Substanzen ermöglichte es, auch kleinste Mengen dieser Verbindungen zu erfassen und ihre Umwandlung in der Zelle zu verfolgen. Die Bestätigung der postulierten Synthesewege wurde durch Reinigung der beteiligten Enzyme und Nachweis der durch sie katalysierten Reaktionen in vitro erbracht. Diese Methoden führten auch zur Aufklärung der Leucin-Biosynthese (Abb. 1) (ABELSON und VOGEL, 1955; STRASSMANN et al., 1955, 1956; GROSS et al., 1962; CALVO et al., 1962; JUNGWIRTH et al., 1963; BURNS et al., 1963). Das charakteristische Enzym des Leucin-Biosyntheseweges, die α-Isopropylmalat-Synthase, konnte inzwischen bei einer Vielzahl von Organismen nachgewiesen werden (JUNGWIRTH et al., 1961; STRASSMANN und CECI, 1963; WEBSTER und GROSS, 1965; HILL, 1968; SAI et al., 1969; BAUMGARTEN, 1969; STIEGLITZ und CALVO, 1974).

Die Biosynthese des Leucins steht in enger Beziehung zu den Synthesewegen der ebenfalls verzweigten Aminosäuren Valin und Isoleucin. Leucin und Valin werden über eine verzweigte Biosynthesekette gebildet. In den ersten Schritten ihrer Synthesewege haben sie gemeinsame Zwischenprodukte. Die Bildung des Isoleucins verläuft über einen Parallelweg zur Valinsynthese.

Die enge Verknüpfung der Biosyntheseketten verlangt eine differenzierte Regulierung der beteiligten Enzyme. Ziel einer solchen Regulierung muß es sein, eine ausgewogene und ökonomische Produktion der einzelnen Aminosäuren zu gewährleisten. Den Organismen stehen mit der allosterischen Hemmung, meist des ersten Enzyms

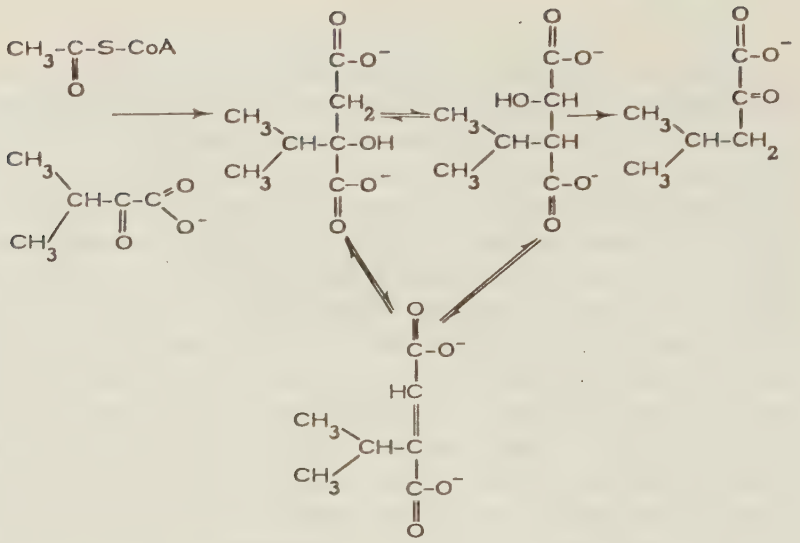

Abb. 1 Die Leucinbiosynthese nach BURNS et al. (1963)

einer Biosynthesekette, und mit der Repression und Derepression der Synthese der beteiligten Enzyme zwei Möglichkeiten der Regulation zur Verfügung.
Die Biosynthese des Leucins scheint bei den meisten Organismen einheitlich zu verlaufen. Das besondere Interesse wendet sich daher den Regulationsmustern dieses Biosyntheseweges zu.

Bei allen daraufhin untersuchten Organismen wird die Synthese des ersten Enzyms der spezifischen Leucin-Biosynthesekette, der α-Isopropylmalat-Synthase, durch Repression und Derepression gesteuert. Die Aktivität des Enzyms wird durch allosterische Endprodukthemmung reguliert.

Eine Aufhebung der durch Leucin bewirkten Aktivitätshemmung durch Valin ist bisher nur für die Enzyme aus den chemolithotrophen Bakterien Hydrogenomonas eutropha H 16 und Micrococcus denitrificans berichtet worden (HILL, 1968). Die Befunde stützten sich zunächst auf Untersuchungen an Rohextrakten der Zellen, konnten aber inzwischen auch für das gereinigte Enzym aus Hydrogenomonas eutropha H 16 bestätigt werden (WIEGEL, 1974).

Im Rahmen einer Voruntersuchung wurde die α-Isopropylmalat-Synthase aus Micrococcus denitrificans zwar angereichert (FISCHER, 1973), doch zeigte sich, daß für eine eingehende Charakterisierung des Enzyms hinsichtlich seiner katalytischen und regulatorischen Eigenschaften eine möglichst weitgehende Reinigung erforderlich war.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Regulation der α-Isopropylmalat-Synthase bei Micrococcus denitrificans, Stamm Morris. Durch Untersuchungen am gereinigten Enzym wurde versucht, einen Einblick in das Regulationsmuster der Leucin-Biosynthese dieses Stammes zu gewinnen.

## 2. METHODEN

### 2.1 Organismen

Die vorliegenden Untersuchungen wurden mit Micrococcus (Paracoccus) denitrificans, Stamm Morris (BANERJEE, 1965), sowie davon abgeleiteten Mutanten durchgeführt. Der Wildtyp stammt aus der Sammlung des hiesigen Instituts und ist unter der Nummer DSM 413 niedergelegt.

### 2.2 Nährlösungen

Die Bakterien wurden in der von SCHLEGEL et al. (1961) angegebenen Minerallösung (ML) angezogen.

| | | | Endkonzentration |
|---|---|---|---|
| I. | $Na_2HPO_4$ x 12 $H_2O$ | 9,0 g | (0,9 %) |
| | $KH_2PO_4$ | 1,5 g | (0,15 %) |
| | $NH_4Cl$ | 1,0 g | (0,1 %) |
| | $MgSO_4$ x 7 $H_2O$ | 0,2 g | (0,02 %) |
| | Spurenelementlsg. SL 4 (nach PFENNIG und LIPPERT, 1966) | 1 ml | |
| | $H_2O$ dest. | 1000 ml | |
| II. | $Fe(NH_4)$-Citrat | 0,1 g | (0,0005 %) |
| | $CaCl_2$ x 2 $H_2O$ | 0,6 g | (0,003 %) |
| | $H_2O$ dest. | 200 ml | |

Nach getrennter Sterilisation wurden 1000 ml der Lsg. I 10 ml der Lsg. II zugesetzt. Für Nährböden enthielt Lsg. I zusätzlich 1,5 % Agar (Difco). Die vollständige Lösung hatte einen pH von 7,0 - 7,2.
Bei chemolithotrophem Wachstum wurde dem Medium 0,05 % $NaHCO_3$ zugefügt und die Kultur mit 80 % $H_2$, 10 % $O_2$ und 10 % $CO_2$ begast. Für organotrophes Wachstum wurde der Nährlösung konzentrierte, sterile Glucoselösung bis zu einer Endkonzentration von 0,5 % zugesetzt.

Bei anaerober Anzucht wurde dem Mineralmedium 1 % $KNO_3$ und 0,5 % Glucose zugegeben. Die Kultur wurde mit Stickstoff begast.
Zur Anzucht auxotropher Mutanten wurden dem Mineral-Glucose-Medium die benötigten Suppline bis zu einer Endkonzentration von 1 mM steril zugesetzt.

Komplettmedien bestanden aus 0,8 % Nutrient Broth (Difco) und 0,5 % NaCl. Sie wurden mit Leitungswasser angesetzt.

## 2.3 Kultivierung und Ernte der Zellen

### 2.3.1 Anzucht des Wildtyps und der Mutanten

Kulturen bis zu 100 ml wurden in Erlenmeyerkolben auf einem Rotationsschüttler oder im Wasserbad bei 28° C bebrütet. Begasung für anaerobes oder auxotrophes Wachstum erfolgte in Witt'schen Töpfen.

Anzuchten bis zu 3 l NL wurden in Zweihals-Rundkolben mit Begasungsaufsatz nach SCHLEGEL et al. (1961) durchgeführt.
Größere Zellmengen wurden bei organotrophem Wachstum im Fermenter Biostat (Fa. Braun, Melsungen) angezogen. Die komplette Nährlösung wurde hierfür durch ein Seitz-Entkeimungsfilter EKS sterilisiert. Die Belüftung der Kultur erfolgte durch Preßluft mit einem Durchsatz von ca. 10 l/min. Die Nährlösung wurde mit einem Blattrührwerk bei 600 UpM gerührt.

### 2.3.2 Anzucht der Mutante HF 144 unter Derepressionsbedingungen

Die Anzucht der doppelt blockierten Mutante HF 144 ($Ile^-$, $Val^-$, $Leu^-$) zur Zellgewinnung für die Enzymanreicherung erfolgte unter Derepressionsbedingungen in einem Fermenter der AG für Biologische Verfahrenstechnik, Basel.
100 l Mineralmedium wurden im Fermenter (Kontaktorsystem) 30 min bei 121° C autoklaviert. Konzentrierte Glucoselösung sowie die Aminosäurelösung (Endkonzentration 300 µM L-Leucin, 500 µM L-Valin und 800 µM L-Isoleucin) wurden danach steril zugesetzt. Beimpft wurde mit ca. 5 l einer gut gewachsenen Vorkultur, die in

Mineral-Glucose-Medium mit je 1 mM L-Leucin, L-Valin und L-Isoleucin im Biostat angezogen worden war.
Die Temperatur betrug bei allen Anzuchten 28° C.

### 2.3.3 Ernte der Zellen

Aus kleineren Kulturen wurden die Zellen durch Abzentrifugieren mit einer Becherzentrifuge (WKF Kühlzentrifuge GS 50 K) geerntet. Für die Ernte der Anzuchten im Biostat wurde eine Cepa-Durchlaufzentrifuge (30 000 UpM) benutzt.
Die Kulturen mit 100 l NL wurden gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase im Fermenter auf 4° C abgekühlt (Einhängethermostat Westfalia) und mit zwei Cepa-Zentrifugen gleichzeitig sofort abzentrifugiert. Die Zellen wurden in Plastikbeuteln eingefroren und bei -20° C gelagert.

## 2.4 Messen des Bakterienwachstums

Je nach Fragestellung wurden zwei Methoden zur Erfassung des Wachstums angewandt.

### 2.4.1 Trübungsmessung

Die Zelldichte der Suspension wurde durch Messung der Extinktion bei 546 nm im Zeiss-Photometer PM 4 bestimmt. Gemessen wurde in 1 cm-Glasküvetten gegen Wasser. Proben mit hoher Zelldichte wurden so verdünnt, daß die Extinktion zwischen 0,1 und 0,3 lag.

### 2.4.2 Lebendzellzahlbestimmung

Die Zahl der zur Koloniebildung befähigten Zellen wurde durch Ausstreichen von geeigneten Verdünnungen mit einem Drigalsky-Spatel auf Platten ermittelt.

## 2.5 Hemmung des Wachstums von M. denitrificans durch Antibiotika

### 2.5.1 Nachweis der Wachstumshemmung

0,1 ml Bakteriensuspension wurden in 3 ml handwarmem Weichagar (0,8 %ig) suspendiert, auf Komplettagar gegeben und durch Schwenken gleichmäßig verteilt. Nach dem Erstarren wurden mit Antibiotika-Lösungen getränkte Filterpapierblättchen (Ø 2 mm) auf den Weichagar gelegt (5 Blättchen/Platte). Die Konzentration der Antibiotika-Stammlösungen betrug 5 mg/ ml; ein Blättchen enthielt ~0,2 mg der zu testenden Substanz.
Die Agarplatten wurden 48 Std. bei 30° C bebrütet und dann durch Ausmessen des Hemmhofes der Grad der Hemmwirkung bestimmt.

### 2.5.2 Bestimmung der Hemmgrenzkonzentration

Von den zu testenden Antibiotika wurde jeweils eine Verdünnungsreihe mit 10 Röhrchen angelegt, die 0,5 - 5000 µg Antibiotikum/ 5 ml Mineral-Glucose-Medium enthielten. Mit einem Tropfen Bakteriensuspension wurden die Röhrchen beimpft und 48 Std. in Schräglage bebrütet. Die Konzentration, bei der die Trübung durch Wachstum der Bakterien nicht mehr zunahm, wurde als Hemmgrenzkonzentration registriert.
Um zu prüfen, ob die betreffenden Antibiotika lediglich das Wachstum hemmten oder die Bakterien abtöteten, wurden den Kulturen Proben entnommen und auf Komplettagar ausplattiert. Die Platten wurden 48 Std. inkubiert und die Kolonien dann ausgezählt.

## 2.6 Mutationsauslösung

### 2.6.1 Behandlung wachsender Zellen mit 1-Nitroso-3-nitro-1-methylguanidin (NG)

Aus einer Vorkultur in der logarithmischen Wachstumsphase wurden 2 ml Zellsuspension in 8 ml frisches, vorgewärmtes Mineral-Glucose-Medium gegeben. Nach zweistündiger Vorinkubation dieser Kul-

tur (Zelltiter ca. 3 x $10^8$/ml) wurden 0,4 ml NG-Lösung (5 mg/ml) zugesetzt und die Suspension weiter inkubiert.

2.6.2 Behandlung mit Äthylmethansulfonat (EMS)

Die Zellen einer 48 Std. in 10 ml Glucose-Mineral-Medium gezogenen Kultur wurden mit 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen und dann erneut in 10 ml frischem Medium inkubiert. Nach zwei Stunden wurden dieser Suspension 0,3 ml EMS zugesetzt.

Aus den Inkubationsgemischen wurden zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen und sofort mit 0,9 %iger NaCl-Lösung weiterverdünnt. Aus geeigneten Verdünnungsstufen wurden 0,1 ml auf Komplettagar plattiert. Nach dreitägiger Inkubation der Platten hatten sich aus den überlebenden Zellen gut zählbare Kolonien gebildet.

2.7 Anreicherung auxotropher Mutanten

Nach der Mutationsauslösung wurden die Zellen durch zweimaliges Zentrifugieren und Wiederaufnehmen gewaschen und dann auf 20 Erlenmeyerkolben mit jeweils 5 ml Komplettmedium verteilt. Zur Mutationsausprägung wurden diese Kulturen 2 Tage inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal gewaschen und in 10 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung resuspendiert. Jeweils 0,5 ml der Zellsuspensionen wurden in $NH_4^+$-freies Medium (5 ml) gebracht und 24 Std. geschüttelt, um intrazelluläre Aminosäurereserven abzubauen. Die Übertragung von jeweils 0,1 ml dieser Kulturen in 5 ml frisches Mineral-Glucose-Medium erlaubte den Wildtyp-Zellen während einer 7stündigen Inkubation weiteres Wachstum. Die Abtötung wachsender Zellen erfolgte durch Zugabe von Ampicillin (Endkonzentration 1 mg/ml Kulturmedium). Die Einwirkung des Antibiotikums wurde nach 14stündiger Inkubation abgebrochen; die Zellen wurden gewaschen und in 1 ml Komplettmedium resuspendiert.
Nach erneuter Anzucht im Komplettmedium und folgender Aminosäureverarmung wurde die Ampicillinbehandlung wiederholt (Recycling). Geeignete Verdünnungsstufen der Zellsuspensionen wurden anschlie-

ßend sofort auf Komplettagar ausplattiert.

Zur Anreicherung von Mutanten, die für L-Valin und L-Isoleucin auxotroph waren, wurden in der oben beschriebenen Prozedur die Komplettmedien durch Mineral-Glucose-Medien, die diese Aminosäuren enthielten, ersetzt.

Mutanten, die zusätzlich im Leucin-Syntheseweg defekt waren, ließen sich ebenfalls nach dieser Methode anreichern: Die Mutationsauslösung erfolgte jedoch an einer für Valin und Isoleucin auxotrophen Mutante; in der Anreicherungsprozedur wurden die Mineral-Glucose-Medien L-Valin und L-Isoleucin (je 1 mM) zugesetzt, und statt der Komplettmedien wurden Mineral-Glucose-Medien verwendet, die die Aminosäuren L-Valin, L-Isoleucin und L-Leucin (je 1 mM) enthielten.

## 2.8 Isolierung der Mutanten

Die Isolierung der auxotrophen Mutanten erfolgte unter Anwendung der „replica-plating"-Technik (LEDERBERG und LEDERBERG, 1952). Die nach der Anreicherung ausplattierten Zellen wuchsen nach dreitägiger Inkubation zu Kolonien heran. Geeignete Platten mit einzeln liegenden Kolonien wurden mit einem sterilen Samtstempel auf Glucose-Mineral-Medium überstempelt. Kolonien, deren Abdrücke auf diesem Nährboden nicht zu neuen Kolonien heranwuchsen, wurden abgeimpft und zur Isolierung von Einzelkolonien auf Komplettagar ausgestrichen. Durch weitere Ausstriche auf Glucose-Mineral-Agar wurde die Stabilität des Wuchsstoffbedarfs geprüft.

## 2.9 Charakterisierung der Mutanten

Zur Identifizierung des Wuchsstoffbedarfs wurden folgende auxanographische Methoden angewandt:

2.9.1 Holliday-Verfahren

Die auf Komplettagar wachsenden Mutanten wurden nach einer von KAUDEWITZ (1958) beschriebenen und nach HOLLIDAY (1956) modifizierten Methode identifiziert. Dabei wurden die Mutanten auf 11 Testplatten, die Aminosäuren, Nucleinbasen und Vitamine in bestimmten Gruppierungen (Tab. 1) enthielten, überstempelt. Da jeder Wuchsstoff in zwei Gruppen enthalten war, konnte der Supplementbedarf nach Inkubation der Platten am Wachstum der Mutanten abgelesen werden.

2.9.2 Kreuzfütterungstest

Mutanten mit gleichem Wuchsstoffbedarf wurden durch Kreuzfütterungsversuche näher charakterisiert.

2.9.2.1 Methode nach LINGENS und OLTMANNS (1964)

Die Mutanten wurden in supplementierten Mineral-Glucose-Lösungen angezogen, zweimal gewaschen und in 0,9 %iger NaCl-Lösung resuspendiert. Jeweils 0,1 ml der Suspensionen wurden mit 3 ml handwarmem Weichagar (0,8 %ig) gemischt, auf Mineral-Glucose-Platten gegeben und durch Schwenken gleichmäßig verteilt. Nach dem Erstarren wurden die anderen Mutanten in Segmenten auf dem Weichagar ausgestrichen. Nach fünftägiger Inkubation der Platten konnte am Wachstum der Bakterien abgelesen werden, welche Mutanten die ausgeschiedenen Akkumulationsprodukte der im Weichagar suspendierten Zellen als Wachstumsfaktor zu nutzen vermochten.

2.9.2.2 Methode von PEARCE und LOUTIT (1965)

Jeweils zwei Mutanten wurden in einigem Abstand voneinander parallel in geraden Strichen auf Mineral-Glucose-Agar überimpft. Zwischen den Impfstrichen wurden im rechten Winkel dazu fünf Mutanten so ausgestrichen, daß sie die ersten beiden nahezu berührten. Nach fünftägiger Inkubation der Platten zeigten einige Mutanten von dorther fortschreitendes Wachstum, wo sie den Impf-

Tab. 1 Zusammensetzung der Testgruppen 1 - 11

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 7 | Adenin | Pantothenat | Phenylalanin | Thiamin | Arginin | Leucin |
| 8 | Cytosin | Alanin | Serin | Cystein | Asparaginsre. | Glycin |
| 9 | Thymin | Riboflavin | Tryptophan | Threonin | Prolin | Isoleucin |
| 10 | Guanin | Valin | Tyrosin | Thiosulfat | Glutaminsre. | Histidin |
| 11 | Uracil | Hypoxanthin | Ornithin | Methionin | Inositol | Lysin |

Von jeder Aminosäure und Nucleinbase wurden je 30 mg pro 50 ml Lösung eingewogen. 1 ml der Gruppenlösung wurde mit ca. 30 ml flüssigem Fructose-Mineral-Agar gemischt und zu einer Platte gegossen.

strichen fütternder Mutanten am nächsten lagen.

## 2.10 Herstellung zellfreier Extrakte

Die bei -20° C gelagerten Zellen wurden aufgetaut und im doppelten Volumen Phosphatpuffer (0,1 M, pH 6,8), der 1 mM α-Ketoisovalerat und 5 mM Valin enthielt, suspendiert. Nach Zusatz einer Spatelspitze DNase und RNase wurde die Zellsuspension in eine auf 0° C vorgekühlte Frenchpresse gegeben, dreimal mit einem Druck von 8 t/cm$^2$ durchgepreßt und in einer gekühlten Vorlage aufgefangen. Zur Abtrennung der Zelltrümmer wurde der Extrakt mit einer Christ-Zentrifuge „Omikron" (1 Std., 100 000 x g) bei 0° C zentrifugiert.
Das klare Überstehende wurde als Rohextrakt für die Versuche verwendet.

## 2.11 Proteinbestimmungen

### 2.11.1 Bestimmung nach BEISENHERZ et al. (1953)

In Rohextrakten wurde der Proteingehalt nach dieser Methode bestimmt.
In einem Zentrifugenröhrchen wurden 0,2 ml des Extraktes mit $H_2O$ bidest. auf 0,85 ml aufgefüllt und mit 0,15 ml Trichloressigsäure versetzt. Das ausgefällte Protein wurde in einer BTL-Zentrifuge bei 3 000 UpM 15 min abzentrifugiert und das Überstehende vollständig abgegossen.
Das Sediment wurde in 4,9 ml $H_2O$ bidest. und 5 ml Biuretreagens aufgelöst. Nach 30 min Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurde gut durchmischt und die Extinktion der Lösung bei 546 nm im Zeiss-Spektralphotometer PM 4 in 2 cm-Küvetten bestimmt. Gemessen wurde gegen einen Ansatz ohne proteinhaltige Lösung.
Eine Eichkurve mit Rinderserumalbumin wurde von 1 - 6 mg Protein aufgenommen.

Herstellung des Biuretreagens:

9 g Seignettesalz
3 g $CuSO_4$ x 5 $H_2O$
5 g KJ

Die Komponenten wurden nacheinander in 400 ml 0,2 N NaOH gelöst und die Lösung mit 0,2 N NaOH auf 1000 ml aufgefüllt.

### 2.11.2 Proteinbestimmung nach LOWRY (1951)

Es wurden folgende Lösungen benutzt:

| | | | |
|---|---|---|---|
| Lsg. A: | 20 | g | $Na_2CO_3$ in 1000 ml 0,1 N NaOH |
| Lsg. B: | 0,1 | g | $CuSO_4$ x 5 $H_2O$ in 100 ml $H_2O$ |
| Lsg. C: | 2 | g | Na-Tartrat in 100 ml $H_2O$ |
| Lsg. D: | 50 | ml | Lsg. A + 0,5 ml Lsg. B + 0,5 ml Lsg. C (tgl. neu angesetzt) |
| Lsg. E: | 20 | ml | Folin-Reagens (Merck) + 40 ml $H_2O$ |

Der zu untersuchende Extrakt wurde mit $H_2O$ so verdünnt, daß die Proteinkonzentration zwischen 25 µg und 500 µg Protein/ml lag. 1 ml der verdünnten Lösung wurde mit 0,2 ml 3 M Trichloressigsäure versetzt, das ausgefällte Protein abzentrifugiert und das Überstehende abgegossen. Das Sediment wurde in 1 ml $H_2O$ aufgenommen und mit 5 ml Lsg. D versetzt. Nach 10 min wurden 5 ml Lsg. E zugegeben. Nach weiteren 30 min Reaktionszeit wurde die Extinktion des Gemisches im Zeiss-Photometer PM 4 bei 500 nm gemessen.
Als Blindwert diente ein Ansatz ohne eiweißhaltige Lösung. Der Proteingehalt wurde mit einer Eichkurve, aufgenommen mit Rinderserumalbumin, bestimmt.

### 2.11.3 Methode nach WARBURG und CHRISTIAN (1941)

In einem Zeiss-Spektralphotometer PM 4 wurde die Extinktion der Proben bei 260 und 280 nm gegen einen Nullwert gemessen. Aus dem Verhältnis beider Meßwerte wurde mit Hilfe einer Tabelle (Nomograph von E. Adams, Calif. Corp. for Biochemical Research, Cali-

fornia) der Proteingehalt ermittelt.

## 2.12 Bestimmung von Enzymaktivitäten

### 2.12.1 Bestimmung der Aktivität der α-Isopropylmalat-Synthase (E.C. 4.1.3)

Die spezifische Aktivität der α-Isopropylmalat-Synthase wurde in Einheiten (E) pro g Protein angegeben. Eine Einheit ist der Umsatz von 1 µmol Substrat pro min.

#### 2.12.1.1 Fluorimetrische Produktbestimmung nach CALVO et al. (1969)

Ansatz:

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 0,20 ml | Puffer (1,25 M $KPO_4$; 1,25 M KCl) | | pH 8,0; | 250 | µmole |
| 0,10 ml | 0,02 | M | K-α-Ketoisovalerat | 2 | µmole |
| 0,10 ml | 0,1 | M | Acetylphosphat (Li-Salz) | 10 | µmole |
| 0,20 ml | 0,01 | M | Coenzym A (reduziert) pH 7,5; | 2 | µmole |
| 0,01 ml | | | Phosphotransacetylase (1 mg Protein/ml) | | |
| 0,38 ml | | | $H_2O$ bidest. | | |

Der Testansatz wurde 5 min bei 37° C im Wasserbad vorinkubiert und die Reaktion dann mit 0,01 ml eines Extraktes gestartet. Nach weiteren 15 min Inkubation (37° C) wurde der Ansatz mit einem Tropfen konz. $H_2SO_4$ gestoppt, im Eisbad gekühlt und mit 5 ml kaltem Äther versetzt.
Die Zentrifugenröhrchen wurden mit einem Schraubdeckel verschlossen, 2 min kräftig geschüttelt und dann 2 min bei 3 000 UpM zentrifugiert. Von der organischen Phase wurden 2 ml in ein Reagenzglas übertragen und bei 60° C im Wasserbad abgedampft.
Der Rückstand wurde sorgfältig in 0,4 ml konz. $H_2SO_4$ gelöst, 5 min bei 60° C inkubiert und nach Abkühlung im Eisbad mit 0,25 ml kalter Resorcinlösung (1 g Resorcin in 5 ml $H_2O$) versetzt. Nach 20 min Inkubation bei 60° C wurde der Ansatz mit

5 ml $H_2O$ verdünnt. 1 ml (Eichkurve a) oder 0,5 ml (Eichkurve b) dieser Verdünnung wurden in ein Reagenzglas übertragen und mit 9,5 ml Borat-Puffer (0,6 M $Na_2CO_3$/0,15 M $H_3BO_3$) gut durchmischt. Die Fluoreszenz der Proben wurde sofort im Eppendorf-Photometer (Netteler & Hinz, Hamburg) mit Fluoreszenzzusatzgerät bestimmt. Die Wellenlänge des anregenden Lichtes betrug 366 nm (Primärfilter Hg 366); das Fluoreszenzlicht wurde durch ein Sekundärfilter (450 - 3 000 nm) gefiltert. Die Proben wurden in Quarzküvetten gegen einen Glasstandard, dessen Fluoreszenz auf 100 Einheiten (voller Anschlag des Photometers) eingestellt war, gemessen. Höhere Meßwerte wurden durch Benutzung des Stufenschalters bestimmt, da eine Verdünnung des Ansatzes keine lineare Beziehung zwischen Fluoreszenz und Verdünnungsgrad ergab.

Eine Eichkurve wurde mit synthetischem DL-α-Isopropylmalat aufgenommen. Die Ansätze dafür enthielten in 1 ml $H_2O$:

| | |
|---|---|
| 0 - 100 µg | DL-α-Isopropylmalat |
| 2 µmole | K-α-Ketoisovalerat |
| 10 µmole | K-Acetat |
| 250 µmole | $KPO_4$; pH 8,0 |
| 1 mg | Rinderserumalbumin |

Das Isopropylmalat wurde nach der angegebenen Methode zu Isopropylumbelliferon umgesetzt und die Fluoreszenz der Ansätze bestimmt. Abb. 2 gibt die lineare Beziehung zwischen eingewogener synthetischer DL-α-Isopropyläpfelsäure und der gemessenen Fluoreszenz der Ansätze wieder.

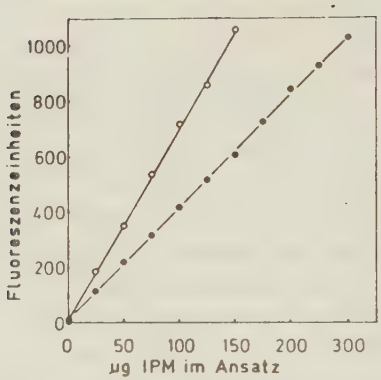


Abb. 2 Eichkurven zur fluorimetrischen Bestimmung der IPM

Das in den Test eingesetzte α-Isopropylmalat wurde zu Isopropylumbelliferon umgesetzt und die Fluoreszenz in alkalischer Lösung bestimmt.

O–O Säureübertrag bei der Präparation 1 ml
●–● Säureübertrag bei der Präparation 0,5 ml

2.12.1.2 Bestimmung der durch Spaltung des Acetyl-Coenzym A freigesetzten SH-Gruppen mit DTNB im optischen Test (verändert nach CALVO et al., 1969)

Ansatz:

| | | |
|---|---|---|
| 0,20 ml | Puffer (1,25 M Tris-HCl; 1,25 M KCl) | pH 8,0 |
| 0,40 ml | 0,001 M | DTNB |
| 0,10 ml | 0,02 M | K-α-Ketoisovalerat |
| 0,20 ml | 0,01 M | Acetyl-SCoA-Lösung |
| 0,19 ml | | $H_2O$ |

Der Test wurde durch Zugabe von 0,01 ml Enzymlösung gestartet und der Ablauf der Reaktion bei 412 nm im Zeiss-Photometer PM 4 verfolgt. 1 µmol freies Coenzym A ergibt eine Extinktionsänderung von 13,6 (ELLMANN, 1959).

2.12.2 Bestimmung der Threonindesaminase (TDA)-Aktivität

Die Messung erfolgte im gekoppelten optischen Test mit Glutamatdehydrogenase nach REH (1967). Die Küvette enthielt:

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 2,60 ml | 0,1 M | Tris-Puffer; pH 9,0; 30° C; | 260 | µmole |
| 0,01 ml | 3 M | $Na_2S$ | 30 | µmole |
| 0,06 ml | | $H_2O$ (ad 3,00 ml) | | |
| 0,10 ml | 10 mg/ml | NADH | 1 | mg |
| 0,02 ml | 0,01 M | PALP | 0,2 | µmole |
| 0,01 ml | 0,25 M | α-Ketoglutarsäure | 2,5 | µmole |
| 0,05 ml | 10 mg/ml | GLDH (Lösung in Glycerin) | 0,5 | mg |
| 0,10 ml | 0,5 M | Threonin | 50 | µmole |

Für größere Meßreihen wurden Tris-Puffer, $Na_2S$, NADH, PALP und α-Ketoglutarsäure in berechneten Mengen gemischt.

Nach einer Minute Vorinkubation wurde die Reaktion durch Zusatz von 0,05 ml Extrakt gestartet und die Extinktionsabnahme des Ansatzes bei 366 nm im Photometer verfolgt. Der Umsatz von 1 µmol NADH ergibt eine Extinktionsänderung von 3,3.

Die Aktivität der Threonindesaminase wurde nach Korrektur der Zahlenwerte um die NADH-Oxidation, die ohne Threoninzusatz (Leerwert) gemessen wurde, errechnet.

2.12.3 Bestimmung der Acetohydroxysäure (AHS)-Synthase-Aktivität

2.12.3.1 Test mit toluolbehandelten Zellen, modifiziert nach HALPERN und UMBARGER (1959)

In ein Zentrifugenglas wurden 1,56 ml gewaschene Zellen (1,5 - 3,0 mg Protein) in 0,1 M Tris-Puffer, pH 9,0, und 0,02 ml Toluol pipettiert. Die Suspension wurde 30 min im Wasserbad bei 30° C inkubiert. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von 0,42 ml einer Lösung gestartet, die folgende Komponenten enthielt: 2 ml 0,5 M Pyruvat; 2 ml 0,05 M $MgCl_2$; 0,2 ml TPP-Lösung (10 mg/ml)

und 0,02 ml FAD-Lösung (0,5 mg/ml).
Nach 15 min Inkubation bei 30° C wurde mit 0,6 ml 20 %iger TES gestoppt und die Zellen abzentrifugiert (3 000 UpM; 5 min). Das Überstehende wurde in ein Reagenzglas überführt und zur Decarboxylierung der α-Acetomilchsäure 15 min in einem Wasserbad bei 60° C gehalten.
Das entstandene Acetoin wurde nach WESTERFELD (1945) bestimmt:

0,25 ml Überstehendes
2,25 ml $H_2O$
0,5 ml 0,5 %ige Kreatinlösung
0,5 ml 5 %ige α-Naphthollösung in 2,5 M NaOH (unmittelbar vor Gebrauch angesetzt)

wurden zusammengegeben und genau 60 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Dann erfolgte die Extinktionsmessung bei 546 nm gegen eine mitgeführte Kontrolle ohne Pyruvatzusatz. Die gebildete Acetoinmenge wurde aus einer Eichkurve, die mit einer Acetoinstandardlösung erhalten wurde, ermittelt.

2.12.3.2 Test mit Rohextrakt, verändert nach UMBARGER und BROWN (1958)

In ein Zentrifugenglas wurden pipettiert:

| | | | |
|---|---|---|---|
| 0,65 ml | 0,1 M Tris-Puffer, pH 9,0 | 65 | µmole |
| 0,21 ml | Mischung von 1 Vol. 0,5 M Na-Pyruvat | 50 | µmole |
| | 1 Vol. 0,1 M $MgCl_2$ | 10 | µmole |
| | 0,1 Vol. 10 mg/ml TPP | 0,1 | mg |
| 0,12 ml | $H_2O$ | | |
| 0,02 ml | Rohextrakt (ca. 20 mg Protein/ml) | | |

Der Ansatz wurde 15 min bei 30° C im Wasserbad inkubiert und die Reaktion dann durch Zugabe von 0,3 ml TES gestoppt. Der Proteinniederschlag wurde abzentrifugiert und im Überstehenden nach Decarboxylierung der α-Acetomilchsäure das Acetoin wie oben beschrieben bestimmt. Die Messung erfolgte hier gegen einen Reagenzienleerwert, bestehend aus 2,5 ml $H_2O$, 0,5 ml Kreatinlösung

und 0,5 ml α-Naphthollösung.

2.12.4 Fructose-1,6-diphosphat-Aldolase (E.C. 4.1.2.7)

Boehringer Information 1964 (nach RACKER, 1947)

2,85 ml TEA-Puffer; pH 7,6; 0,05 M
0,05 ml NADH (10 mg/ml)
0,05 ml Fructose-1,6-diphosphat (Na-Salz, 30 mg/ml)
0,02 ml Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase/Triosephosphat-Isomerase (2 mg/ml)
0,01 ml Enzymlösung

Die Extinktionsänderung wurde bei 366 nm verfolgt.

2.12.5 Katalase (E.C. 1.11.1.6)

Boehringer Information 1962 (nach BERGMEYER, 1955)

2,98 ml Peroxidlösung (pH 7,0; 0,05 ml Perhydrol-Merck mit 0,05 M $KPO_4$-Puffer auf 50 ml auffüllen)
0,02 ml Enzymlösung

Die Extinktionsabnahme wurde bei 240 nm gemessen.

2.13 Darstellung von Acetyl-SCoA und Propionyl-SCoA

100 - 500 mg CoA-SH wurden in 5 - 25 ml $H_2O$ ($0^\circ$ C) gelöst und mit festem $KHCO_3$ auf pH 7,0 eingestellt.
Das entsprechende Acylanhydrid wurde unter stetem Schütteln tropfenweise zur CoA-SH-Lösung zugesetzt, bis sich mit DTNB keine freien SH-Gruppen mehr nachweisen ließen. Danach wurde der pH-Wert der Lösung mit 1 M HCl auf ~4,0 eingestellt, und überschüssiges Anhydrid sowie die entstandene freie Säure durch dreimaliges Ausschütteln mit kaltem Äther ($0^\circ$ C, zehnfaches Volumen an Äther) extrahiert. Nachdem der pH-Wert durch Zusatz von festem $KHCO_3$ auf pH 6,0 erhöht worden war, wurde die Lösung in 2 ml-Portionen eingefroren und bei $-20^\circ$ C gelagert.

## 2.14 Konzentrationsbestimmung von CoA-SH und den Acylderivaten

### 2.14.1 Coenzym A (CoA-SH)

Die Konzentration von CoA-SH wurde im optischen Test mit DTNB bestimmt (ELLMANN, 1959; ROBYT et al., 1971).
Der Ansatz enthielt:

| | | |
|---|---|---|
| | 0,95 ml | 0,05 M Tris-HCl-Puffer; pH 8,0<br>mit 3,9 mg DTNB/100 ml Puffer |
| 0,005 - 0,05 ml | | CoA-SH-Lösung (0 - ca. 0,08 µmole CoA-SH) |
| | | $H_2O$ ad 1 ml |

Die Extinktionsänderung sollte dabei unter 1 bleiben.
1 µmol freies CoA-SH ergibt eine Extinktionsänderung bei 412 nm von 13,6 ± 0,6 (ELLMANN, 1959).
Die Ac-SCoA-Präparationen wurden mit diesem Test auf freies CoA-SH überprüft.

### 2.14.2 Acetyl-SCoA (Ac-SCoA)

Ac-SCoA-Konzentrationen wurden durch die Freisetzung von CoA-SH bei der durch die Citrat-Synthase (E.C. 4.1.3.7) katalysierten Addition von Oxalacetat mit Ac-SCoA im DTNB-Test bestimmt.
Der Testansatz enthielt:

| | | |
|---|---|---|
| | 0,9 ml | 250 mM Tris-HCl-Puffer; pH 8,0<br>mit 3,9 mg DTNB/100 ml Puffer |
| 0,005 - 0,02 ml | | Ac-SCoA |
| | 0,02 ml | Citrat-Synthase |
| | 0,04 ml | 0,01 M Oxalacetat |
| | | $H_2O$ ad 1 ml |

Die Extinktionsänderung bei 412 nm sollte dabei 1,0 nicht wesentlich überschreiten.

### 2.14.3 Propionyl-SCoA

Die Konzentration von Propionyl-SCoA wurde nach alkalischer Hydrolyse durch Nachweis des freigesetzten CoA-SH bestimmt. 0,1 ml der zu bestimmenden Lösung wurden mit 0,9 ml Diäthylamin/HCl-Puffer (100 mM, pH 10,5) gemischt. Aliquots dieser Lösung wurden zu verschiedenen Zeiten entnommen und im DTNB-Test (Abschnitt 2.14.1) der Gehalt an CoA-SH bestimmt. Nach 1 min Inkubation bei pH 10,5 ließ sich bereits keine weitere Hydrolyse mehr nachweisen.

## 2.15 Anreicherung der α-Isopropylmalat-Synthase

Die Bereitung des Rohextraktes erfolgte bei $0^{\circ}$ C wie unter 2.10 beschrieben. Für die Enzymanreicherung wurden jeweils 15 g Zellen (Naßgewicht) aufgeschlossen und die Fraktionierung mit ~25 ml Rohextrakt, der 20 - 25 mg Protein/ml enthielt, begonnen. Die erste Gelfiltration wurde im Kühlraum (~$5^{\circ}$ C) durchgeführt, die nachfolgenden Fraktionierungen erfolgten bei Raumtemperatur ($22^{\circ}$ C).
Die Säuleneluate wurden jeweils mit einem Fraktionssammler (Ultrorac, LKB, Bromma, Schweden) aufgefangen. Die Transmission der Eluate bei 280 nm wurde in einem Durchflußphotometer (Uvicord, LKB) gemessen und mit Hilfe eines Fallbügelschreibers (LKB) aufgezeichnet. Die Proteinbestimmung in den Fraktionen erfolgte zusätzlich durch Messen der Absorption bei 280 nm in einem Zeiss-Photometer PM 4 in 1 cm-Quarzküvetten.

### 2.15.1 Gelfiltration mit Sephadex G 200

Der Rohextrakt wurde durch Unterschichten auf eine Säule mit Sephadex G 200 (Gelbett Ø 5 cm; Länge 55 cm) aufgetragen. Das Gel war gegen 0,1 M $KPO_4$-Puffer; pH 6,8; mit 1 mM KIV und 5 mM Valin äquilibriert. Die Elution des Extraktes erfolgte mit diesem Puffer bei einem Arbeitsdruck von 30 cm Wassersäule; die Durchflußgeschwindigkeit lag bei 30 ml/Std. 6 ml-Fraktionen wurden aufgefangen, auf Aktivität der IPM-Synthase getestet und

die „aktiven" Fraktionen vereinigt.

2.15.2 Chromatographie an Sephadex DE - A 50

Die weitere Fraktionierung des Extraktes erfolgte an Sephadex DE - A 50 in einer Säule (Gelbett Ø 2,6 cm; Länge 30 cm). Das Gel war gegen 0,1 mM $KPO_4$-Puffer (pH 6,8), der 1 mM KIV, 5 mM Valin und 5 % Glycerin enthielt, äquilibriert. Nach Zusatz von 5 % Glycerin wurde das „aktive" Eluat der Gelfiltration auf die Säule aufgetragen und durch linear steigende KCl-Konzentration (0 - 500 mM) mit dem angegebenen Puffer (2 x 500 ml) bei einem Druck von 50 cm Wassersäule eluiert. Fraktionen von 6 ml wurden aufgefangen und auf Aktivität der IPM-Synthase getestet. Die „aktiven" Fraktionen wurden vereinigt und durch Ultrafiltration (s. 2.15.7) auf 2 ml eingeengt.

2.15.3 Gelfiltration mit Sephadex G 25

Mit Hilfe der Gelfiltration an Sephadex G 25 fine wurde der Extrakt umgepuffert und für den nachfolgenden Trennungsschritt äquilibriert. 2 ml Extrakt wurden über eine Säule mit 15 ml Gel, das gegen 0,1 mM Tris-HCl-Puffer; pH 7,5; 1 mM KIV; 5 mM Valin und 5 % Glycerin äquilibriert war, gegeben und mit diesem Puffer eluiert.

2.15.4 Chromatographie an DEAE-Cellulose

Der Extrakt wurde auf eine Säule mit DEAE-Cellulose DE 52 (Gelbett Ø 1,5 cm; Länge 20 cm) gegeben, die gegen den oben aufgeführten Tris-HCl-Puffer äquilibriert war. Die Elution erfolgte bei einem Arbeitsdruck von 50 cm Wassersäule mit einem linearen KCl-Gradienten (0 - 250 mM) in diesem Puffer (2 x 250 ml). Das Eluat wurde in 6 ml-Fraktionen aufgefangen und auf Aktivität der IPM-Synthase getestet. „Aktive" Fraktionen wurden vereinigt und durch Ultrafiltration auf 2 ml eingeengt.

2.15.5 Chromatographie an Hydroxylapatit

Der Extrakt wurde durch Gelfiltration mit Sephadex G 25 (s. 2.15.3) gegen $KPO_4$-Puffer (10 mM; pH 6,8; 1 mM KIV; 5 mM Valin; 5 % Glycerin) äquilibriert und auf eine Säule mit Hydroxylapatit Biogel HT (Fa. Biorad Laboratories, Richmond, USA) aufgetragen (Gelbett Ø 1,5 cm; Länge 10 cm). Die Elution erfolgte mit Phosphat-Puffer linear steigender $KPO_4$-Konzentration (10 - 100 mM; 2 x 250 ml), der ebenfalls die oben aufgeführten Zusätze enthielt. Der Arbeitsdruck betrug 80 cm Wassersäule; aufgefangen wurden 7 ml-Fraktionen. Die „aktiven" Fraktionen wurden vereinigt und durch Ultrafiltration auf 1 ml eingeengt.

2.15.6 2. Gelfiltration mit Sephadex G 200

Der Extrakt wurde durch Unterschichten des überstehenden Puffers auf eine Säule mit Sephadex G 200 superfine aufgetragen (Gelbett Ø 2,5 cm; Länge 95 cm). Das Gel war mit $KPO_4$-Puffer (50 mM; pH 6,8; 1 mM KIV; 5 mM Valin und 5 % Glycerin) äquilibriert. Die Elution erfolgte mit diesem Puffer bei einem Arbeitsdruck von 20 cm Wassersäule; aufgefangen wurden 7 ml-Fraktionen. „Aktive" Fraktionen wurden vereinigt und durch Ultrafiltration auf 2 ml eingeengt.

2.15.7 Ultrafiltration

Die Ultrafiltration erfolgte in Diaflo-Kammern (Amicon N.V., Den Haag, Holland) mit einem Nutzvolumen von 10, 50 und 200 ml. Der Extrakt wurde in den Kammern mit einem Magnetstab kräftig, jedoch ohne Schaumbildung gerührt und mit 3 atü Stickstoff überlagert. Die eingelegten Filter XM 50 hatten eine definierte Durchlaßgrenze von 50 000 Dalton.

2.15.8 Lagerung des gereinigten Enzyms

Zur Aufbewahrung wurde die Enzymlösung mit Azid (Endkonzentration 0,002 %) versetzt und bei $4^{\circ}$ C gelagert. Der Aktivitätsverlust

betrug in 14 Tagen ~30 %.
Für die kinetischen Untersuchungen wurde der jeweilige Tagesbedarf an Enzym entnommen und der Puffer des Extraktes durch Gelfiltration mit Sephadex G 25 (s. 2.15.3) gegen reinen $KPO_4$-Puffer (50 mM; pH 6,8) ausgetauscht.

## 2.16 Gelelektrophoretische Methoden

### 2.16.1 Analytische Disk-Gelelektrophorese nach MAURER (1968)

Die Polyacrylamidgele wurden aus folgenden Komponenten hergestellt:

a)
| | | |
|---|---|---|
| 1 N HCl | 48,0 | ml |
| Tris | 6,85 | g |
| Temed | 0,46 | ml |
| $H_2O$ ad | 100 | ml |

b)
| | | |
|---|---|---|
| Acrylamid | 30,0 | g |
| Bis | 0,8 | g |
| $H_2O$ ad | 100 | ml |

c)
| | | |
|---|---|---|
| Per | 0,14 | g |
| $H_2O$ ad | 100 | ml |

Die Lösungen wurden kurz vor Bereitung des Gels wie folgt gemischt:

1 Teil a
2 Teile b
1 Teil $H_2O$
4 Teile c

Jeweils 1,2 ml des Gemisches wurden in gut gereinigte Glasröhrchen (Ø 0,5 cm; Höhe 7,5 cm) gegeben und sofort mit $H_2O$ überschichtet, um Meniskusbildung zu vermeiden.
Die Röhrchen wurden in eine Trennkammer (Shandon Scientific Co., Ltd., London, England; Kapazität 8 Röhrchen) eingesetzt. Der Elektrodenpuffer (pH 7,0) bestand aus 5,52 g Diäthylbarbitursäure und 1 g Tris in 1 l $H_2O$. Als Netzgerät diente das Modell Vokam SAE 2761 (Shandon).

Die Proteinlösungen wurden durch Zusatz von Saccharose (Endkonzentration 10 %) beschwert und mit einigen Kristallen Bromphenolblau als Markierungssubstanz versetzt. Proben von 10 - 50 µl (20 - 100 µg Protein) wurden durch vorsichtiges Unterschichten des Puffers auf die Gele aufgetragen und die Trennung mit 2,5 mA/Röhrchen bei einer Laufzeit von 1,5 - 2 Std. durchgeführt.

2.16.2 Porengrößegradientengel-Elektrophorese

Die Trennung von Proteinen mit Hilfe der Gradientengel-Elektrophorese (Porengrößegradient) wurde nach der von MARGOLIS und KENRICK (1968) beschriebenen Methode, verändert nach G. WOLF (pers. Mitteilung) durchgeführt.
Die Glasröhrchen (Ø 6 cm, Höhe 12 cm) waren mit Gelen, die durch linear steigende Konzentrationen an Acrylamid (4 - 30 %) einen zunehmenden Vernetzungsgrad aufwiesen, ca. 10 cm hoch gefüllt. Zur Durchführung der Elektrophorese wurde die oben (s. 2.16.1) beschriebene Apparatur benutzt. Der Elektrodenpuffer hatte folgende Zusammensetzung:

| | | |
|---|---|---|
| Tris | 10,75 g | |
| Borsäure | 5,04 g | |
| EDTA | 0,93 g | |
| $H_2O$ ad 100 | ml | pH 8,3 |

Die Proteinlösungen wurden durch Zusatz von Saccharose (Endkonzentration 10 %) beschwert und durch Unterschichten des Puffers auf die Gele aufgetragen (~100 µg Protein/Röhrchen). Die Elektrophorese wurde zunächst 1 Std. bei einer konstanten Spannung von 100 V durchgeführt, dann wurde die Spannung auf 200 V erhöht. Die Trennung war nach 24 Std. beendet.

### 2.16.3 Färbemethoden und Auswertung der Elektrophorese

#### 2.16.3.1 Proteinfärbung

Eine unspezifische Färbung der Proteinbanden in den Gelen erfolgte:

1. durch Inkubation in einer Lösung von 10 % Amidoschwarz in 7 %iger Essigsäure. Der Farbstoff wirkte 30 min auf das Gel ein; entfärbt wurde in einem 7 %igen Essigsäurebad.
2. durch einstündige Inkubation in folgender Färbelösung (nach VESTERBERG, 1972):

| | | |
|---|---|---|
| 0,3 | g | Coomassie Brilliant Blue R 250 |
| 9,0 | g | Sulfosalizylsäure |
| 30,0 | g | Trichloressigsäure |
| 75 | ml | Methanol |
| 186 | ml | $H_2O$ bidest. |

Die Gele wurden 12 Std. in 5 %iger Essigsäure entfärbt.

Die Lage der Banden wurde densitometrisch bei 620 nm registriert (Densitometer Chromoscan; Joyce, Loebl & Co., Ltd., Gateshead, England) und die Wanderungsstrecken ausgemessen.

#### 2.16.3.2 Nachweis der IPM-Synthase im Gel

Zum spezifischen Nachweis der IPM-Synthase in den Gelen wurde der DTNB-Test (s. 2.12.1.2) verwendet. Das Gel wurde wenige Minuten in 3 ml des Testgemisches inkubiert. An der Ausbildung einer gelben Bande durch das bei der Reaktion entstehende Thiophenolat wurde die IPM-Synthase im Gel identifiziert. Da die gelbe Zone sich durch Diffusion des Farbstoffes schnell verbreitete, wurde die Lage der Bande sofort densitometrisch bei 465 nm registriert (Densitometer Chromoscan; Joyce, Loebl & Co., Ltd., Gateshead, England) und mit Hilfe eines feinen Drahtes markiert. Nach anschließender Proteinfärbung konnte die enzymatisch aktive Zone einer Proteinbande zugeordnet werden.

## 2.17 Molekulargewichtsbestimmung

### 2.17.1 Gelfiltration mit Sephadex G 200

Das Molekulargewicht der IPM-Synthase wurde durch Gelfiltration in einer Säule mit Sephadex G 200 superfine (Gelbett Ø 2,5 cm; Länge 95 cm) bestimmt (nach ANDREWS, 1962). Das Gel war gegen $KPO_4$-Puffer (50 mM; pH 6,8; 1 mM KIV; 5 mM Valin) äquilibriert. Aufgetragen wurden 1 ml des Extraktes, in dem als Eichsubstanzen folgende Proteine aus der Boehringer Combithek gelöst waren:

| Protein | MG |
|---|---|
| Ferritin | 540 000 |
| Katalase | 240 000 |
| Aldolase | 147 000 |
| Rinderserumalbumin | 67 000 |
| Cytochrom c | 12 500 |

Die Elution erfolgte mit dem angegebenen $KPO_4$-Puffer bei einem Arbeitsdruck von 25 cm Wassersäule, aufgefangen wurden Fraktionen mit einem Volumen von 2,2 ml. Die Verteilung der Proteine in den Fraktionen wurde durch Messen der enzymatischen Aktivitäten (Katalase, Aldolase, IPM-Synthase) oder der Absorption (Ferritin $\Delta E_{546\ nm}$, Cytochrom c $\Delta E_{412\ nm}$, Albumin $\Delta E_{280\ nm}$) bestimmt.

### 2.17.2 Elektrophorese in Gradientengelen

Das Molekulargewicht der IPM-Synthase wurde weiterhin durch Elektrophorese in Gelen mit zunehmendem Vernetzungsgrad ermittelt (nach WOLF, Inst. f. Pflanzenpathologie, Universität Göttingen). Die Apparatur und die Durchführung der Elektrophorese sind in Kap. 2.16.2 beschrieben.
Als Referenzprotein wurden der Enzymlösung 100 µg Rinderserumalbumin, das in den Gelen drei Banden mit definiertem Molekulargewicht bildet, zugesetzt. Nach der Elektrophorese wurde die IPM-Synthase in den Gelen mit Hilfe des DTNB-Tests identifiziert, die Proteinbanden nach der in Kap. 2.16.3.1 beschriebenen Methode gefärbt und die Wanderungsstrecken ausgemessen.

## 2.18 Chemikalien

Es wurden handelsübliche Chemikalien der Fa. Merck (Darmstadt) benutzt.
Die speziellen Chemikalien und Biochemikalien hatten folgende Herkunft:

α-Ketoisovalerat und Coenzym A; Sigma Chemical Company, St. Louis, USA.
Phosphotransacetylase, Fructose-1,6-Diphosphat, Glycerol-3-P-Dehydrogenase/Triosephosphat-Isomerase und Eichproteine; Fa. Boehringer & Söhne, Mannheim.
Aminosäuren; Fluka AG, Buchs, Schweiz.
Acrylamid, BIS, TEMED, Ammoniumpersulfat, Amidoschwarz, Coomassie Brilliant Blue R 250 und DTNB; Fa. Serva, Heidelberg.
4-Azaleucin; Calbiochem, Los Angeles, Calif., USA.
NMG; Fa. Lights & Co., Ltd., Colmbrook, England.
EMS; Fa. Eastman Organic Chemicals, Rochester, N. Y., USA.
DEAE-Cellulose DE 52; Whatman, Balston Ltd., England.
Sephadex G 25 (medium), Sephadex G 200 (fine, superfine) und DEAE-Sephadex A 50; Fa. Roth OHG, Karlsruhe.
Biogel HT; Fa. Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA.
Actidion; The Upjohn Comp., Kalamazoo, Michigan, USA.
6-Aminopenicillansäure, Ampicillin, Oxacillin und Streptomycin; Fa. Bayer, Leverkusen.
Aureomycin; Fa. Lederle, München.
Novobiocin; Fa. Merck Sharp & Dohme, Research Lab., N. Y., USA.
Penicillin G; Fa. Dauelsberg & Co., Göttingen.
Vancomycin; Fa. Eli Lilly & Co., Indianapolis, USA.
Colistinsulfat, Bacitracin und Chlortetracyclin; Fa. Grünenthal GmbH, Stolberg.

DL-5',5',5'-Trifluorleucin war eine Sonderanfertigung der Pierce Chemical Comp., Rockford, USA. DL-α-Isopropyläpfelsäure wurde dankenswerterweise von Herrn Prof. Dr. W. R. Martin, Chicago, USA; die Porengrößegradientengele von Herrn Priv. Doz. Dr. G. Wolf, Göttingen, zur Verfügung gestellt.

# 3. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

## 3.1 Bestimmung der Aktivität der α-Isopropylmalat-Synthase

Wie die meisten daraufhin untersuchten Mikroorganismen verfügt Micrococcus denitrificans über das charakteristische Enzym des Leucin-Biosyntheseweges, die α-Isopropylmalat-Synthase (HILL, 1968; FISCHER, 1973). Das Enzym katalysiert die irreversible Addition von Acetyl-Coenzym A mit α-Ketoisovalerat (KIV) zu α-Isopropylmalat (IPM); als weiteres Produkt der Reaktion wird Coenzym A (CoA-SH) freigesetzt (JUNGWIRTH et al., 1961).

Zur Aktivitätsbestimmung der IPM-Synthase bieten sich folgende Methoden an: Der Ablauf der Reaktion wird durch Verfolgen der Abnahme an Acetyl-CoA und der Bildung an freiem CoA-SH erfaßt, oder das Kondensationsprodukt der Reaktion, IPM, wird quantitativ bestimmt. Da jedoch Rohextrakte und wenig gereinigte Enzympräparate von Micrococcus denitrificans das eingesetzte Acetyl-CoA sehr schnell durch andere Enzyme spalteten, ließ sich die Additionsreaktion nicht durch Messen der Substratabnahme oder der Bildung von CoA-SH im optischen Test verfolgen. Zur Bestimmung der Aktivität in Rohextrakten ist deshalb nur der quantitative Nachweis des gebildeten α-Isopropylmalats geeignet.

### 3.1.1 Bestimmung der Enzymaktivität durch fluorimetrische Produktbestimmung

Die fluorimetrische Bestimmung des α-Isopropylmalats wurde in einem standardisierten Test nach Angaben von CALVO et al. (1969) und WIEGEL (1974) durchgeführt. Das in der enzymatisch katalysierten Reaktion gebildete Produkt α-Isopropylmalat wurde aus dem Testgemisch mit Äther extrahiert. Der quantitative Nachweis beruht auf der Reaktion des IPM mit konzentrierter Schwefelsäure zu β-Ketoisocapronsäure und deren Umsetzung mit Resorcin zu 4-Isopropylumbelliferon, das sich fluorimetrisch bestimmen läßt (STRASSMANN und CECI, 1963; 1967).

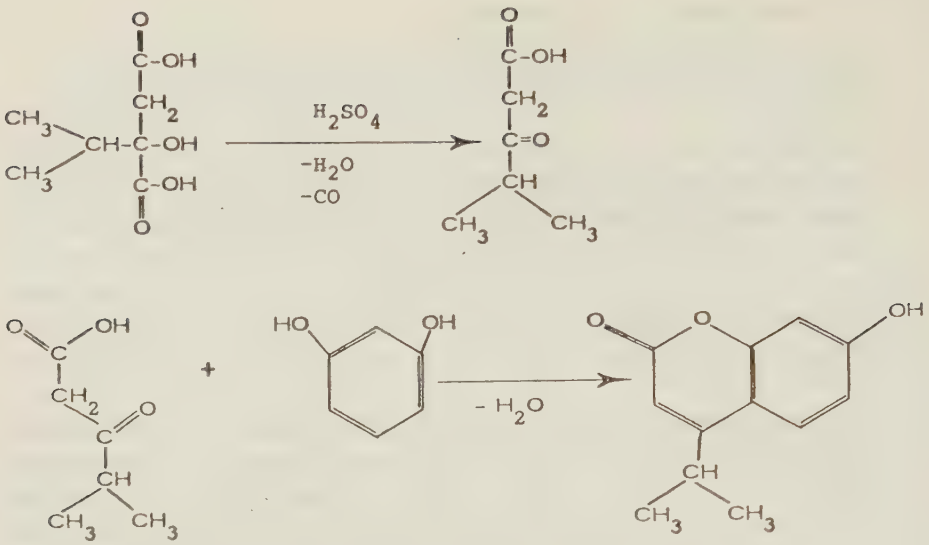


Abb. 3 Die Bildung des 4-Isopropylumbelliferons nach CALVO et al. (1969), verändert

Der Vorteil des Tests liegt in seiner Spezifität; die Hydroxysäuren Glykolsäure, Citronensäure, Milchsäure, Weinsäure und Äpfelsäure stören den Nachweis des IPM nicht nennenswert (WIEGEL, 1974). Der Nachteil liegt neben dem großen Arbeits- und Zeitaufwand insbesondere darin, daß sich der Ablauf der Reaktion nur durch Entnahme von Proben aus dem Reaktionsgemisch und nachfolgender quantitativer Bestimmung des Produktes verfolgen läßt. Der von HILL (1968) angegebene Testansatz wurde für die Bestimmung der Aktivität der IPM-Synthase aus Micrococcus denitrificans optimiert; Rohextrakte wiesen unter den in der Legende zu Abb. 4a aufgeführten Bedingungen eine spez. Aktivität von 12,5 E/g Protein auf. Als repräsentativer Wert für die Reaktionsrate wurde routinemäßig die im Laufe von 15 min gebildete IPM-Menge bestimmt. Die Reaktion verlief im gemessenen Zeitraum linear zur Inkubationszeit (Abb. 4a). Die Abhängigkeit der Rate der IPM-Bildung von der eingesetzten Extraktmenge ist in Abb. 4b dargestellt. Die gemes-

sene Aktivität der IPM-Synthase war der eingesetzten Proteinmenge bis zu 2,5 g proportional; höhere Proteinmengen bewirkten eine relativ niedrigere IPM-Bildung. Durch Weglassen einzelner Komponenten des Testansatzes wurde die IPM-Bildung erheblich verringert (Tab. 2).

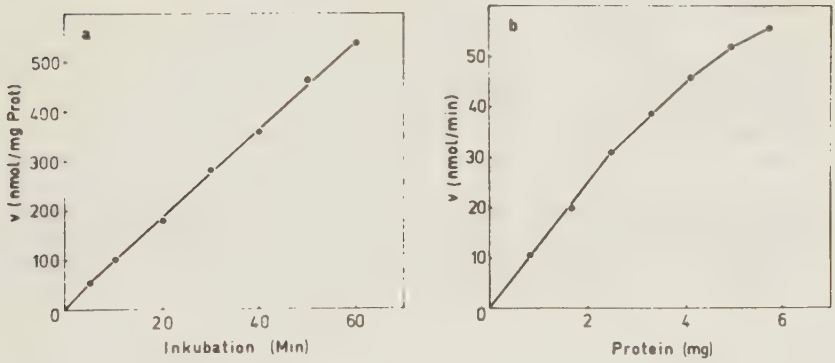


Abb. 4a Der zeitliche Verlauf der IPM-Bildung durch einen zellfreien Extrakt aus M. denitrificans, Stamm Morris

Abb. 4b Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der IPM-Synthase von der eingesetzten Rohextraktmenge

a) Die Ansätze enthielten in einem Volumen von 1,0 ml: 250 µmole $KPO_4$-Puffer, pH 8,0; K-Ketoisovalerat 2 µmole; KCl 250 µmole; $Li_2$-Acetylphosphat 10 µmole;Coenzym A 0,2 mg; Phosphotransacetylase 10 µg.
Nach 5 min Vorinkubation des Ansatzes bei 37° C wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,05 ml (0,9 mg Protein) eines Rohextraktes aus Zellen von M. denitrificans, Stamm Morris, gestartet. Das Abstoppen erfolgte zu den angegebenen Zeiten durch Zugabe eines Tropfens konzentrierter $H_2SO_4$. Die Ansätze wurden in der unter „Methoden" angegebenen Weise aufgearbeitet und das Isopropylmalat fluorimetrisch bestimmt.

b) Testgemisch wie in Abb. 4a. Die Extraktmenge wurde wie angegeben variiert. Reaktionsdauer 15 min.

Tab. 2 Die Verringerung der α-IPM-Bildung durch Weglassen einzelner Komponenten des Testansatzes

| Ansatz | Fluoreszenz-einheiten | nmole α-IPM gebildet | % des kompletten Tests |
|---|---|---|---|
| komplett | 279 | 223 | 100 |
| -Extrakt | 12 | 0 | 0 |
| -Coenzym A | 19 | 6,2 | 2,8 |
| -Acetylphosphat | 19 | 6,2 | 2,8 |
| -KIV | 31 | 15,9 | 7,1 |
| -Phosphotrans-acetylase | 24 | 10,2 | 4,6 |
| komplett, t = 0 | 17 | 0 | 0 |

Das Testgemisch hatte die in Abb. 4a aufgeführte Zusammensetzung. Einzelne Komponenten wurden wie angegeben weggelassen. Die Ansätze wurden durch die Zugabe von 0,93 mg Protein eines Rohextraktes von M. denitrificans gestartet und 15 min bei 37° C inkubiert.

### 3.1.2 Bestimmung der Enzymaktivität im optischen Test bei 412 nm

Im Verlauf der Enzymanreicherung (vgl. Kap. 3.4) konnte die Thioesterase-Aktivität von der IPM-Synthase-Aktivität getrennt werden. Dadurch war es möglich, die Aktivität der IPM-Synthase in gereinigten Enzympräparaten durch Bestimmung des in der enzymatischen Reaktion freigesetzten CoA zu messen. Die SH-Gruppen des Coenzyms reagieren bei pH 8,0 oder höher mit 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoat) (DTNB) zu einem gemischten Disulfid und 3-Carboxy-4-nitrothiophenolat, das bei 412 nm ein Absorptionsmaximum aufweist (ELLMANN, 1959). Da die IPM-Synthase nicht durch DTNB gehemmt wurde, ließ sich der Ablauf der enzymatischen Reaktion im optischen Test verfolgen.

Eine Bestimmung der Enzymaktivität durch Messen der Abnahme des Substrates Acetyl-CoA, das bei 232 nm eine charakteristische

Absorption zeigt (OCHOA, 1955; STRASSMANN und CECI, 1961), war nicht möglich. Zur Sättigung des Enzyms mußte das Substrat in so hohen Konzentrationen zugesetzt werden (vgl. Kap. 3.5.6.2), daß die Absorption des Testansatzes photometrisch nicht mehr meßbar war.

## 3.2 Versuche zur „biologischen Anreicherung" der IPM-Synthase

Die spezifische Aktivität am anabolischen Stoffwechsel beteiligter Enzyme ist in normal angezogenen Zellen oft sehr gering. Auch die Aktivität der IPM-Synthase in Rohextrakten von Micrococcus denitrificans lag so niedrig, daß für eingehendere Untersuchungen eine Anreicherung des Enzyms notwendig erschien. Da eine Anreicherung durch Proteinfraktionierung sehr arbeitsaufwendig ist, war es wünschenswert, von Rohextrakten mit hoher spezifischer Aktivität des Enzyms auszugehen.

In einfachen Nährmedien gezogene Zellen weisen für Enzyme, deren Synthese durch Repression und Derepression gesteuert wird, auch in der logarithmischen Wachstumsphase der Kultur oft nur mittlere Aktivitäten auf. Die genetische Kapazität für die Enzymsynthese wird von den Organismen bei weitem nicht voll ausgenutzt. Durch Störungen der Regulationsmechanismen und durch Anzucht der Bakterien unter bestimmten Kulturbedingungen konnte nachgewiesen werden, daß sich die Syntheserate vieler Enzyme des anabolischen Stoffwechsels erheblich steigern läßt, so daß eine „biologische Anreicherung" erfolgt.

Eine dereprimierte Bildung von Enzymen der Aminosäurebiosynthesewege läßt sich erreichen, wenn es gelingt, einen intrazellulären Mangel der betreffenden Aminosäure hervorzurufen.

Insbesondere drei Methoden sind gebräuchlich, um Mikroorganismen zu einer erhöhten Syntheserate von Enzymen des anabolischen Stoffwechsels zu veranlassen:

a) Die Kulturen werden in Gegenwart eines Antimetaboliten angezogen, der zwar nicht die Funktion des natürlichen Metaboliten als Zellbaustein übernehmen kann, aber aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit mit dem Endprodukt des Biosyntheseweges regulatorisch wirksam ist und eine „false feedback inhibition" (MOYED, 1960a) bewirkt. Der daraus resultierende Mangel an natürlichen Metaboliten führt bei vielen Organismen zu einer gesteigerten Syntheserate der Enzyme des blockierten Syntheseweges.

b) Wird eine Bakterienpopulation in Gegenwart eines Antimetaboliten inkubiert, treten häufig Mutanten auf, deren Toleranz gegenüber dem Antimetaboliten höher ist als die der Wildtypzellen. Oft weisen diese Mutanten eine veränderte Regulation der Enzymsynthese auf; die Enzyme des blockierten Biosyntheseweges werden konstitutiv dereprimiert gebildet (ADELBERG, 1958).

c) Eine erhöhte Bildung von Enzymen eines Biosyntheseweges läßt sich ebenfalls erreichen, wenn geeignete auxotrophe Mutanten unter Mangelbedingungen angezogen werden.

Bei einigen Mikroorganismen führte die Anwendung dieser drei Methoden auch zu einer dereprimierten Synthese der IPM-Synthase (FREUNDLICH et al., 1962; CALVO und UMBARGER, 1964; FREUNDLICH und CLARKE, 1968). Mit den im folgenden beschriebenen Versuchen wurde geprüft, ob sich die spezifische Aktivität der IPM-Synthase in Rohextrakten von Micrococcus denitrificans, Stamm Morris, durch entsprechende Manipulationen ebenfalls erhöhen läßt.

### 3.2.1 Die spezifische Aktivität der IPM-Synthase in verschiedenen Stadien einer Kultur von Micrococcus denitrificans

In Salmonella typhimurium und Hydrogenomonas H 16 unterliegt die IPM-Synthase, das erste spezifische Enzym des Leucinbiosyntheseweges, einer Endproduktrepression durch Leucin (CALVO und UMBARGER 1963; WIEGEL, 1974). Es war zu erwarten, daß das Enzym während der logarithmischen Wachstumsphase von statischen Kulturen hohe Aktivitäten erreicht, da das Endprodukt des Biosyntheseweges, das Leucin, in diesem Stadium sehr schnell für die Proteinsynthese herangezogen wird. Während dieses für die IPM-Synthase aus Hydrogenomonas H 16 bestätigt werden konnte (WIEGEL, 1974), wiesen KOHLHAW et al. (1969) nach, daß das Enzym aus Salmonella typhimurium erst während der stationären Wachstumsphase in der relativ höchsten Aktivität vorliegt. Die Autoren führen diese Beobachtung auf eine veränderte Permeabilität der Zellmembran für Leucin zurück: Durch intrazellulären Leucinmangel wird die Bildung der IPM-Synthase dereprimiert.
Bestimmungen der IPM-Synthase in verschiedenen Stadien einer Kultur zeigten, daß auch bei M. denitrificans der Enzymspiegel der Zellen während des Wachstumsverlaufs ansteigt (FISCHER, 1973). Das Enzym erreicht gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase die höchste spezifische Aktivität (Abb. 5). Danach erfolgt ein steiler Aktivitätsabfall und bei Beginn der stationären Phase zeigt die IPM-Synthase bereits weniger als 50 % der maximalen Aktivität.

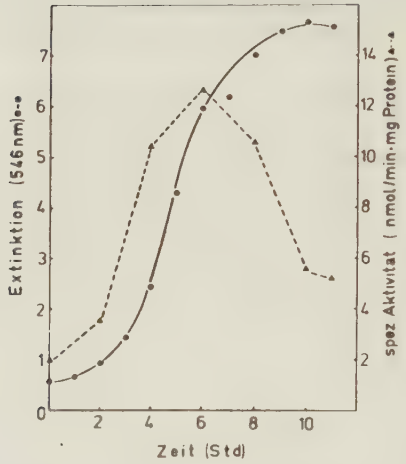


Abb. 5 Die Aktivität der IPM-Synthase während des Wachstums einer Kultur von M. denitrificans (nach FISCHER, 1973)

500 ml Zellsuspension aus einer logarithmisch wachsenden Vorkultur wurden in einen Braun-Fermenter mit 8 l Mineral-Glucose-Medium übertragen und bei 28° C herangezogen. Proben von 500 ml wurden zu den angegebenen Zeiten dem Fermenter steril entnommen, die optische Dichte der Suspension bei 546 nm gemessen und die Zellen durch Zentrifugation abgetrennt. Der Zellaufschluß erfolgte durch Ultraschallbehandlung. Die Aktivität der IPM-Synthase wurde im fluorimetrischen Test bestimmt.

### 3.2.2 Die Repression der Enzymbildung

Die steigende spezifische Aktivität der IPM-Synthase während des Wachstums einer Kultur von M. denitrificans weist darauf hin, daß die Synthese des Enzyms, ebenso wie bei allen bisher untersuchten Organismen, durch Repression und Derepression gesteuert wird. Während die Bildung der IPM-Synthase in Salmonella typhimurium, Neurospora, Hydrogenomonas H 16 und Arthrobacter St. 23 einer Endproduktrepression durch Leucin unterliegt (CALVO und UMBARGER,

1963; WEBSTER und GROSS, 1965; HILL, 1968; BAUMGARTEN, 1969), wird die Synthese des Enzyms in Saccharomyces spec. durch Threonin oder, verstärkt, durch Threonin + Leucin reprimiert (SATYANARAYANA et al., 1968b).

Eine Steuerung der Enzymsynthese durch Repression sollte an der verminderten Bildung des Enzyms zu erkennen sein, wenn die Zellen in Gegenwart möglicher Corepressoren angezogen werden. Um zu prüfen, ob die Bildung der IPM-Synthase in M. denitrificans sich ebenfalls reprimieren läßt, wurde bei der Anzucht dem Mineral-Glucose-Medium Leucin, Valin, Isoleucin oder Threonin zugesetzt (FISCHER, 1973).

Tab. 3 Der Einfluß verschiedener Aminosäuren auf die Bildung der IPM-Synthase (nach FISCHER, 1973)

| Zusatz zum Mineral-Glucose-Medium | Konzentration | Aktivität der IPM-Synthase (E/g Protein) |
|---|---|---|
| kein Zusatz | 5 mM | 11,8 |
| L-Leucin | 5 mM | 4,9 |
| L-Valin | 5 mM | 12,6 |
| L-Isoleucin | 5 mM | 12,1 |
| L-Threonin | 5 mM | 10,9 |

Die Zellen wurden in Mineral-Glucose-Medium mit den angegebenen Zusätzen im Braun-Fermenter gezogen und nach 6 Std. geerntet. Der Zellaufschluß und die Aktivitätsbestimmung erfolgten in der unter „Methoden" beschriebenen Weise.

Tab. 3 zeigt, daß die Zellen, die in Gegenwart von 5 mM Leucin angezogen wurden, gegenüber in einfachem Medium gezogenen eine um fast 60 % niedrigere Aktivität der IPM-Synthase aufwiesen. Zusätze von Valin, Isoleucin oder Threonin zum Nährmedium haben dagegen keinen Einfluß auf die Synthese des Enzyms.

### 3.2.3 Versuche zur Derepression der Enzymbildung

#### Die Hemmung des Wachstums von Micrococcus denitrificans durch Antimetaboliten der Aminosäuren Valin und Leucin

Eine erhöhte Bildung der IPM-Synthase in Mikroorganismen läßt sich erreichen, wenn es gelingt, einen intrazellulären Mangel an Valin oder Leucin zu erzeugen. Das kann durch Hemmung einzelner Enzyme des gemeinsamen Biosyntheseweges (vgl. Abb. 11) durch Antimetaboliten erfolgen. So hemmt 2-Aminobuttersäure bei Escherichia coli W und Arthrobacter Stamm 23 die Acetohydroxysäure (AHS)-Synthase, das erste Enzym des Syntheseweges (FREUNDLICH und CLARKE, 1968; BAUMGARTEN, 1969). Trifluorleucin hemmt die IPM-Synthase von Salmonella typhimurium und Hydrogenomonas H 16 (CALVO und UMBARGER, 1964; HILL, 1968), das Enzym aus Salmonella typhimurium wird durch 4-Azaleucin ebenfalls gehemmt (STIEGLITZ und CALVO, 1968).

Eine Blockierung des Biosyntheseweges sollte eine Hemmung des Wachstums zur Folge haben, wenn die Bakterien in Gegenwart der Antimetaboliten angezogen werden.

#### 3.2.3.1 Wachstum von M. denitrificans und Aktivität der IPM-Synthase bei Anzucht mit 2-Aminobuttersäure

Die wachstumshemmende Wirkung der 2-Aminobuttersäure ist für mehrere Bakterien beschrieben worden (HORVATH et al., 1964, P. aeruginosa, E. coli; FREUNDLICH und CLARKE, 1968, E. coli; BAUMGARTEN, 1969, Arthrobacter St. 23; WIEGEL, 1974, Hydrogenomonas H 16). Nach einigen Stunden Inkubation läßt die bakteriostatische Wirkung des Antimetaboliten jedoch nach, und die Zellen beginnen mit steigender Rate zu wachsen. Aus dem Verlauf der Wachstumskurven wurde auf eine „induzierte phänotypische Resistenz" (MOYED, 1960b) der Zellen geschlossen, die auf einer erhöhten Syntheserate der durch die 2-Aminobuttersäure gehemmten Enzyme des Valin-Biosyntheseweges beruht (HORVATH et al., 1964; 1967; FREUNDLICH und CLARKE, 1968). Als Folge des durch den Anti-

metaboliten bewirkten Mangels an Valin und seinen Vorstufen konnte weiterhin eine erhöhte Bildung der IPM-Synthase nachgewiesen werden (BAUMGARTEN, 1969; WIEGEL, 1974).

Untersuchungen von FISCHER (1973) zeigten, daß auch M. denitrificans gegen den Antimetaboliten empfindlich ist; die Wachstumskurven in Gegenwart 2-Aminobuttersäure gezogener Kulturen zeigten einen ähnlichen Verlauf wie die von Arthrobacter St. 23 und E. coli. Nach einer anfänglichen Hemmung adaptierten sich die Zellen und wuchsen dann mit steigender Rate. Um die Wirkung des Antimetaboliten auf die Enzymsynthese während der Übergangshemmung zu erfassen, wurde Aminobuttersäure bis zu einer Endkonzentration von 10 mM einer wachsenden Kultur von M. denitrificans

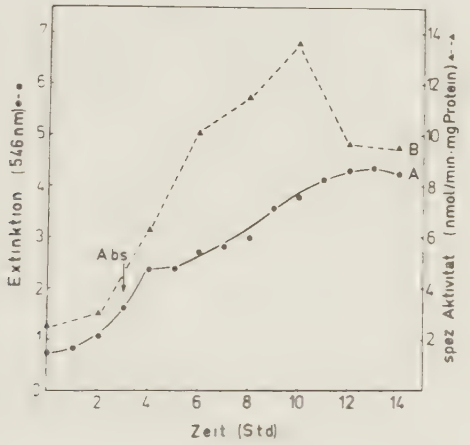


Abb. 6 Die spezifische Aktivität der IPM-Synthase während des Wachstums einer Kultur von M. denitrificans in Gegenwart von 2-Aminobuttersäure (nach FISCHER, 1973)

Versuchsgang wie in Abb. 5. Nach drei Stunden (Pfeil) wurde der Kultur steril filtrierte 2-Aminobuttersäure bis zu einer Endkonzentration von 10 mM zugesetzt. Probenentnahme, Wachstumsmessungen und Aktivitätsbestimmungen der IPM-Synthase erfolgten wie in Abb. 5 angegeben.

zugesetzt (nach FISCHER, 1973). Zu den angegebenen Zeiten wurden der Kultur Proben entnommen und die Aktivität der IPM-Synthase der Zellen bestimmt. Abb. 6 zeigt, daß nach der Zugabe des Antimetaboliten während der Wachstumshemmung die Aktivität des Enzyms zwar ansteigt, jedoch nicht über das normale Niveau hinausgeht (vgl. Abb. 5). Höhere Konzentrationen an Aminobuttersäure im Nährmedium bewirkten zwar eine stärkere Wachstumshemmung, eine gesteigerte Enzymsynthese wurde aber ebenfalls nicht erreicht.

### 3.2.3.2 Die wachstumshemmende Wirkung der leucin-analogen Aminosäuren Trifluorleucin und 4-Azaleucin

Die bakteriostatische Wirkung von 5',5',5',-Trifluorleucin auf das Wachstum von Salmonella typhimurium ist von CALVO und UMBARGER (1964) beschrieben worden. Von den Autoren wurden zwei Arten von Mutanten isoliert, die gegen den Antimetaboliten resistent sind. Entweder war das regulatorisch empfindliche Enzym des Leucinweges, die IPM-Synthase, gegen Leucin und Trifluorleucin unempfindlich geworden, oder die Enzyme des Leucinweges wurden konstitutiv dereprimiert gebildet. Die Mutanten mit dereprimierter Leucinsynthese wiesen gegenüber dem Wildtyp zehnfach höhere Aktivitäten für die beteiligten Enzyme auf (CALVO und UMBARGER, 1964). Ähnliche Mutanten sind von Hydrogenomonas H 16 und Neurospora crassa isoliert worden (WEBSTER und GROSS, 1965; HILL und SCHLEGEL, 1969b).
HILL (1968) und FISCHER (1973) zeigten, daß M. denitrificans gegen den Antimetaboliten wenig empfindlich ist. In Flüssigkeitskulturen ließ sich das Wachstum der Bakterien erst durch 20 mM Trifluorleucin hemmen.
4-Azaleucin, eine aus Streptomyces spec. isolierte Aminosäure (ARGOUDELIS et al., 1967), unterdrückte das Wachstum von Submerskulturen dagegen bereits bei einer Konzentration von 10 mM (Abb. 7). Geringere Konzentrationen verlängerten zwar die lag-Phase des Wachstums, doch wuchsen die Bakterien in der log-Phase mit annähernd gleicher Rate wie in Kulturen ohne Antimetabolitzusatz. STIEGLITZ und CALVO (1971) beschrieben für Salmonella typhimurium in Gegenwart des Antimetaboliten einen ähnlichen

Wachstumsverlauf. Die Ursache der Resistenz ist nicht geklärt: Die Autoren zeigten, daß die Enzyme des Leucinbiosyntheseweges, insbesondere die durch den Antimetaboliten hemmbare IPM-Synthase, nicht in erhöhtem Maß gebildet werden.

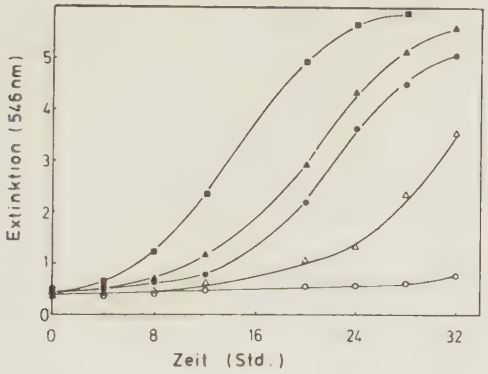


Abb. 7 Das Wachstum von M. denitrificans in Gegenwart von 4-Azaleucin

Aus einer logarithmisch wachsenden Vorkultur wurden 1 ml Bakteriensuspension in Erlenmeyerkolben mit 30 ml frischer Mineral-Glucose-Nährlösung und den angegebenen Konzentrationen an 4-Azaleucin übertragen. Die Ansätze wurden bei 28° C im Wasserbad geschüttelt. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben steril entnommen und das Wachstum der Zellen durch Messen der Trübung bei 546 nm verfolgt.

kein Zusatz (■)
3 mM 4-Azaleucin (▲)
5 mM 4-Azaleucin (●)
8 mM 4-Azaleucin (△)
10 mM 4-Azaleucin (○)

Wurde Micrococcus denitrificans auf Agarplatten, die jeweils 50 mM der Antimetaboliten enthielten, ausplattiert, wuchsen nach zehntägiger Inkubation langsam einzelne Kolonien; nach achtzehn Tagen hatte sich jedoch ein geschlossener Bakterienrasen gebildet. In Fütterungsversuchen mit leucin-auxotrophen Mutanten zeigte sich, daß auch die „frühen" Kolonien kein Leucin ausschieden. Eine erhöhte Bildung der IPM-Synthase konnte nach Anzucht von Kulturen dieser Kolonien ebenfalls nicht nachgewiesen werden; auch ließ sich die IPM-Synthase weiterhin durch Leucin hemmen. Dennoch wiesen die Kolonien eine verstärkte Resistenz gegen die Antimetaboliten auf: Sowohl in Flüssigkeits-Kulturen als auch auf Agarplatten, die Trifluorleucin oder 4-Azaleucin enthielten, wuchsen sie schneller als nicht adaptierte Zellen.

Es bleibt zu prüfen, ob sich nach Mutagenisierung des Wildtyps Mutanten isolieren lassen, die eine veränderte Regulation der Leucin-Biosynthese aufweisen.

### 3.3 Die Aktivität der IPM-Synthase in der für Valin, Isoleucin und Leucin auxotrophen Mutante HF 144

Eine dereprimierte Bildung der IPM-Synthase ist bei einigen Mikroorganismen erreicht worden, wenn für Valin, Isoleucin und Leucin-auxotrophe Mutanten unter Mangelbedingungen angezogen wurden (FREUNDLICH et al., 1962; HILL, 1968; BAUMGARTEN, 1972; WIEGEL, 1974). Da M. denitrificans auch bei der Anzucht mit Antimetaboliten der verzweigten Aminosäuren keine gesteigerte Synthese des Enzyms zeigte, wurde untersucht, ob sich eine „biologische Anreicherung" der IPM-Synthase ebenfalls mit Hilfe geeigneter auxotropher Mutanten durchführen läßt. Deshalb wurde zunächst eine Methode ausgearbeitet, die eine gezielte Anreicherung von Mutanten, die einen Defekt in der Biosynthese der Aminosäuren Valin und Isoleucin oder Leucin aufweisen, ermöglicht. Im folgenden werden diese Mutanten dann charakterisiert, und es wird über die Anzucht einer zweifach blockierten Mutante ($Ile^-$, $Val^-$, $Leu^-$) unter Mangelbedingungen berichtet.

### 3.3.1 Ausarbeitung einer Methode zur Anreicherung und Isolierung auxotropher Mutanten

#### 3.3.1.1 Mutationsauslösung

Spontane auxotrophe Mutanten treten in Bakterienpopulationen nur sehr selten auf; SCHLEGEL et al. (1965) geben für Hydrogenomonas H 16 eine Rate von $10^{-6}$-$10^{-8}$ an. Doch läßt sich die Mutationsrate durch Strahlung und mutagene Agenzien soweit erhöhen, daß die Mutanten einer direkten Selektion zugänglich werden.
Aus der Vielzahl bisher bekannter Mutagene wurde für die Mutationsauslösung bei M. denitrificans 1-Nitroso-3-nitro-1-methylguanidin (NG) und Äthylmethansulfonat (EMS) gewählt. Durch Methylierung und Äthylierung der Nucleinbasen führen sie zu Ablesefehlern bei der identischen Reduplikation der Desoxyribonucleinsäuren und setzen so das Koloniebildungsvermögen der Bakterien herab (CERDA-OLMEDO und HANAWALT, 1968; RHAESE und BOETKER, 1973).

NG und EMS wurden einer Kultur von M. denitrificans in der logarithmischen Wachstumsphase zugesetzt; die Inaktivierung der Zellen ist in Abb. 8 wiedergegeben. Während NG sofort zu einer starken Abtötung der Bakterein führt, wurden die Zellen durch EMS erst nach einer Phase geringer Wirkung verstärkt inaktiviert. Mit zunehmender Inkubationszeit nahm die Abtötungsrate dann in beiden Ansätzen ab; REH (1967) führte diesen Effekt auf eine Verschiebung der Population zugunsten physiologisch wenig aktiver Zellen zurück, bei denen die Mutagene nur gering wirksam sind. Nach Zugabe der mutagenen Agenzien wurde die Inkubation zu verschiedenen Zeiten abgebrochen, die Zellsuspension auf jeweils mehrere Kölbchen mit NB-medium verteilt und zur Mutationsausprägung inkubiert. Die Isolierung und Identifizierung der Mutanten erfolgte in der unter „Methoden" (Kap. 2.8) beschriebenen Weise. Neben auxotrophen wurden durch geeignete Selektion insbesondere eine Vielzahl von Mutanten isoliert, die Glucose nicht mehr verwerten konnten, aber mit Succinat als Kohlenstoff- und Energiequelle wuchsen. Die Mutantenhäufigkeit sowie die „Mutationsspektren", die durch Behandlung mit NG und EMS erhalten wurden, sind

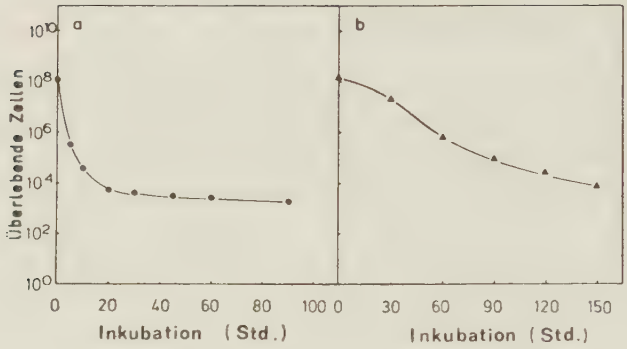


Abb. 8 Die Inaktivierung von M. denitrificans durch mutagene Agenzien

Die Mutagene wurden den Kulturen in der logarithmischen Wachstumsphase zugesetzt. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben steril entnommen und die Zahl der überlebenden Zellen durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungsstufen auf NB-Agar bestimmt. Zur Mutationsauslösung dienten:

a) 1-Nitroso-3-nitro-1-methyl-guanidin (0,2 mg/ml)

b) Äthylmethansulfonat (0,03 mg/ml)

in Tab. 4 und Tab. 5 wiedergegeben. Bei der Auswertung wurden nur Mutanten mit unterschiedlichen Defekten aus einem Kölbchen erfaßt und als Mutationsereignisse gezählt, da die Zellen während der Inkubation zur Merkmalsausprägung sich vermehren konnten und sonst Doppelisolierungen von Mutanten, die sich aus einem Mutationsereignis herleiten, möglich wären. Die geringe Anzahl der isolierten Mutanten erlaubt keine eingehende statistische Auswertung der Versuche, da aber mit NG als mutationsauslösendem Agens die Mutationsrate bis zu 3 % der überlebenden Zellen betrug und ein breites Spektrum an Mutanten erzielt wurde, war es für die folgenden Untersuchungen das Mittel der Wahl.

Tab. 4 Der Einfluß von NG und EMS auf die Mutationsrate bei M. denitrificans

| mut. Agens | Einwirkungs-dauer | Kolonien getestet | Mutanten gefunden | Mutanten % der Überlebenden |
|---|---|---|---|---|
| NG | 5 | 2012 | 35 | 2,05 |
| | 15 | 435 | 10 | 2,3 |
| | 30 | 380 | 12 | 3,15 |
| | 60 | 257 | 8 | 3,1 |
| EMS | 30 | 428 | 3 | 0,7 |
| | 60 | 317 | 3 | 0,95 |
| | 90 | 309 | 2 | 0,97 |
| | 120 | 259 | 3 | 1,16 |
| | 150 | 364 | 3 | 0,82 |

Die Mutationsauslösung wurde wie in Abb. 8 angegeben durchgeführt. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben genommen und geeignete Verdünnungsstufen auf Komplettagar ausplattiert. Durch Überstempeln auf Mineral-Glucose-Agar und Vergleich der Platten nach Inkubation bei 30° C wurden die Mutanten selektiert.

Tab. 5 Wuchsstoffbedarf der isolierten Mutanten

| Nährstoff | Anzahl der Mutanten | Nährstoff | Anzahl der Mutanten |
|---|---|---|---|
| Adenin | 8 | Thiamin | 4 |
| Adenin/Hypoxanthin | 11 | Histidin | 9 |
| Uracil | 4 | Arginin | 3 |
| Serin/Glycin | 7 | Tryptophan | 1 |
| Serin | 2 | Leucin | 2 |
| Cystein/Thiosulfat | 7 | Valin | 1 |
| Thiosulfat | 3 | Prolin | 2 |
| Methionin | 6 | Biotin | 2 |
| Cystein | 11 | Succinat | 76 |
| Arginin/Ornithin | 2 | unbestimmt | 10 |

Die in mehreren Versuchsansätzen durch NG induzierten Mutanten wurden isoliert und der Wuchsstoffbedarf durch Überstempeln auf supplementhaltigen Agar bestimmt.

### 3.3.1.2 Anreicherung von Mutanten

Tab. 5 zeigt, daß Mutanten, die einen Defekt in der Biosynthese der verzweigten Aminosäuren aufweisen, relativ selten auftreten; die Isolierung einer größeren Anzahl dieser Mutanten wäre also nur unter großem Arbeitsaufwand möglich. Deshalb war es wünschenswert, die Mutanten vor der Isolierung anzureichern.
Zur Anreicherung auxotropher Mutanten bietet sich insbesondere die „Penicillin-Technik" nach DAVIES (1948) und LEDERBERG und ZINDER (1948) an. Grundlage dieser Methode ist der Befund, daß Penicillin nur wachsende Zellen abtötet und somit zu einer relativen Anreicherung der nichtwachsenden Mutanten in einer Mischpopulation führt. Nach BANERJEE (1965) bildet M. denitrificans jedoch während der Inkubation mit diesem Antibiotikum eine Resistenz aus und ist somit zur Mutantenanreicherung nur bedingt geeignet. Deshalb wurde zunächst geprüft, gegen welche Antibiotika M. denitrificans empfindlich ist und welches Antibiotikum die Bedingung erfüllt, bei der Abtötung zwischen wachsenden und nichtwachsenden Zellen zu diskriminieren.

#### 3.3.1.2.1 Empfindlichkeit von M. denitrificans gegen Antibiotika

Um einen Überblick über die Wirksamkeit verschiedener Antibiotika gegen M. denitrificans zu gewinnen, wurden zunächst mit Lösungen der in Tab. 6 aufgeführten Antibiotika getränkte Filterpapierblättchen auf Agarplatten mit gleichmäßig ausplattierten Zellen der Bakterien gebracht. Nach zweitägiger Inkubation der Platten hatte sich ein Bakterienrasen gebildet, doch zeigten sich um die meisten Blättchen wachstumsfreie Höfe.
Bis auf Actidion hemmten alle eingesetzten Antibiotika das Wachstum von M. denitrificans; in den durch Penicillin G und Bacitracin gebildeten Höfen wuchsen jedoch einzelne Kolonien heran. BANERJEE (1965) hatte bereits über die auftretende Resistenz von M. denitrificans gegen Penicillin berichtet.
Die Bestimmung der Grenzkonzentration an Antibiotika, die das Wachstum der Bakterien gerade noch unterdrücken, wurde in einem Reihenverdünnungstest durchgeführt (Tab. 6).

Tab. 6 Bestimmung der Grenzkonzentration, bei der ausgewählte Antibiotika das Wachstum von M. denitrificans hemmen

| | Konzentration (µg/ml) | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Antibiotikum | 1000 | 500 | 100 | 50 | 10 | 5 | 1 | 0,5 | 0,1 |
| Actidion | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Colimycin | - | - | - | - | x | x | + | + | + |
| Streptomycin | - | - | - | - | + | + | + | + | + |
| Novobiocin | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| Vancomycin | - | - | - | - | - | x | + | + | + |
| Cycloserin | - | x | x | + | + | + | + | + | + |
| Chlortetracyclin | - | - | - | - | - | x | + | + | + |
| Kanamycin | - | - | - | - | x | + | + | + | + |
| Colistin | - | - | - | - | - | - | x | + | + |
| Bacitracin | - | - | + | + | + | + | + | + | + |
| Glycin | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Penicillin G | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Oxacillin | - | - | - | - | - | - | - | x | + |
| Ampicillin | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| Ristocetin | - | - | - | - | - | - | x | + | + |

Reagenzgläser mit 5 ml Mineral-Glucose-Medium und den angegebenen Antibiotika wurden mit einem Tropfen Bakteriensuspension beimpft und in Schräglage bebrütet. Wachstum der Bakterien wurde bei Trübungszunahme (+) registriert. Ausstriche der Kulturen zeigten durch Koloniebildung (x) an, ob die Antibiotika das Wachstum nur gehemmt oder die Zellen abgetötet hatten.

Penicillin G und Actidion erwiesen sich auch in hohen Konzentrationen als unwirksam. Besonders empfindlich waren die Bakterien gegen Oxacillin, Ampicillin, Ristocetin, Novobiocin und Colistin. Sie hemmten das Wachstum von M. denitrificans bereits in Konzentrationen von 1 µg/ml.

3.3.1.2.2 Die Abtötung wachsender Zellen durch Ampicillin

Eine Anreicherung auxotropher Mutanten durch Antibiotika kann nur erfolgen, wenn die Substanzen zwischen wachsenden und nicht-wachsenden Zellen unterscheiden. Da aus den Vorversuchen auxotrophe Mutanten zur Verfügung standen, konnte in einem Modellversuch geprüft werden, welche Antibiotika diese Bedingung erfüllen.
Die leucin-auxotrophe Mutante HF 1 und der Wildtyp wurden durch Inkubation in stickstoffreiem Medium an intrazellulären Reservestoffen verarmt, anschließend im Verhältnis 1:1 gemischt und dann in Glucose-Mineral-Medium mit einem Zusatz von 1 mg/ml Ampicillin oder Colistin inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden den Kulturen Proben entnommen und geeignete Verdünnungsstufen auf Mineral-Glucose-Agar und supplementhaltigem Agar ausplattiert. Nach der Inkubation der Platten ließ sich durch Auszählen der Kolonien sowohl die Gesamtzahl der lebenden Zellen als auch die Anzahl der überlebenden Wildtypzellen bestimmen.

Während Colistin, das von REH (1967) zur Anreicherung von auxotrophen Mutanten von Hydrogenomonas H 16 erfolgreich eingesetzt wurde, bei M. denitrificans sowohl den wachsenden Wildtyp als auch die ruhenden Mutanten gleichermaßen abtötete, diskriminierte Ampicillin zwischen beiden Zelltypen. Abb. 9 zeigt, daß nach zehnstündiger Inkubation mit diesem Antibiotikum die Gesamtzahl der lebenden Zellen nur auf ~ 30 % der eingesetzten Zellen abgenommen hatte, während nur ~ 0,01 % der Wildtypzellen die Behandlung überlebten.

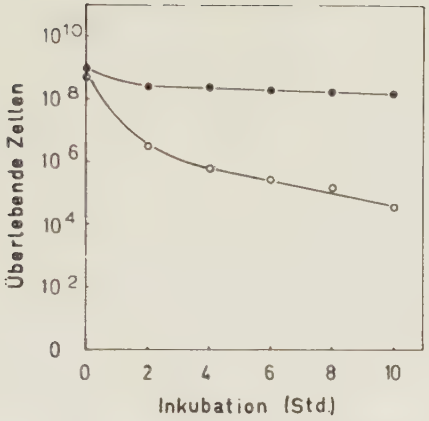


Abb. 9 Die Wirkung von Ampicillin auf wachsende und nichtwachsende Zellen von M. denitrificans

Zellen des Wildtyps und der Mutante HF 1 ($Leu^-$) wurden an Stickstoff verarmt und in Mineral-Glucose-Medium mit einem Zusatz von Ampicillin (1 mg/ml) inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben genommen und die Gesamtzahl der lebenden Zellen sowie die des Wildtyps bestimmt.

### 3.3.1.3 Anreicherung und Isolierung für die verzweigten Aminosäuren auxotropher Mutanten

Die hohe Abtötungsrate durch Ampicillin sollte ermöglichen, Mutanten eines bestimmten Stoffwechseltyps soweit anzureichern, daß eine Isolierung ohne großen Aufwand erfolgen kann. Doch wurden in Kulturen nach Mutationsauslösung, Anzucht der Zellen zur Mutationsausprägung in supplementhaltigen Medien und anschliessender Inkubation mit Ampicillin weniger als 1 % Mutanten gefunden, die für Isoleucin und Valin oder Leucin auxotroph waren. Deshalb erschien eine zweite Behandlung mit dem Antibiotikum zur weiteren Anreicherung vorteilhaft (vgl. „Methoden", Kap. 2.7). Durch „recycling" des Anreicherungsschrittes, wie von LUBIN (1962) erstmals vorgeschlagen, konnte der Anteil der leucin-

auxotrophen Mutanten bei geeigneten Bedingungen zur Selektion und Anzucht auf 80 % der Gesamtpopulation erhöht werden. Wurden Versuchsbedingungen zur Isolierung für Valin und Isoleucin bedürftige Mutanten gewählt, betrug der Anteil dieser Mutanten bis zu 10 % der überlebenden Zellen.
Durch Mutationsauslösung bei der für Isoleucin und Valin auxotrophen Mutante HF 106 und anschließender Selektion auf Medien, die Leucin enthielten, wurden weiterhin Doppelmutanten isoliert, die außer valin- und isoleucin- auch leucinbedürftig waren.
Die Identifizierung und Isolierung der Mutanten erfolgte jeweils mit Hilfe der „replica plating"-Technik nach LEDERBERG und ZINDER (1948); aufgrund der guten Anreicherung war eine Vorselektion nach der „pin point"-Methode (HEGEMANN, 1966) nicht erforderlich.

### 3.3.1.4 Charakterisierung der Mutanten

Es wurden insgesamt 54 Mutanten isoliert, die für Leucin auxotroph waren; weitere 37 Mutanten benötigten Isoleucin und Valin, und 5 Mutanten wuchsen mit Isoleucin. Durch Mutagenisierung der isoleucin-valin-auxotrophen Mutante HF 106 wurden 20 Mutanten erhalten, die für alle drei Aminosäuren auxotroph waren.
Bei allen isoleucinbedürftigen Mutanten ließen sich die Nährmedien durch α-Aminobuttersäure supplementieren; in enzymatischen Tests mit Rohextrakten der Mutanten konnte keine aktive Threonin-Desaminase nachgewiesen werden.
Zur Charakterisierung der für Isoleucin und Valin auxotrophen Mutanten wurden zunächst Kreuzfütterungsversuche nach PEARCE und LOUTIT (1965) durchgeführt. Von der Mutation konnten die drei Enzyme betroffen sein, die die Synthese von Valin und Isoleucin gemeinsam katalysierten (vgl. Abb. 10); doch wurden nur zwei Fütterungsgruppen erhalten. Von den 37 Mutanten fütterten lediglich 6 Mutanten das Wachstum der übrigen. Der Enzymdefekt dieser 6 Mutanten konnte nicht bestimmt werden. Den übrigen 31 Mutanten fehlte die α-Acetohydroxysäure (AHS)-Synthase; sowohl in enzymatischen Tests mit ganzen Zellen als auch mit Rohextrakten konnte dieses Enzym nicht nachgewiesen werden.
Der Supplementbedarf der Mutante HF 106 ($Ile^-$, $Val^-$), die einen

Defekt der AHS-Synthase aufweist, ist in Abb. 10 dargestellt. Optimale Wachstumsraten wurden erzielt, wenn dem Nährmedium mindestens 750 µM Valin und 500 µM Isoleucin zugesetzt wurden. Als Ursache für den relativ hohen Valinbedarf kann angenommen werden, daß die Zellen diese Aminosäure desaminieren und das α-Ketoisovalerat, ein gemeinsames Zwischenprodukt der Valin- und Leucin-Synthese, zur Bildung des Leucins heranziehen.

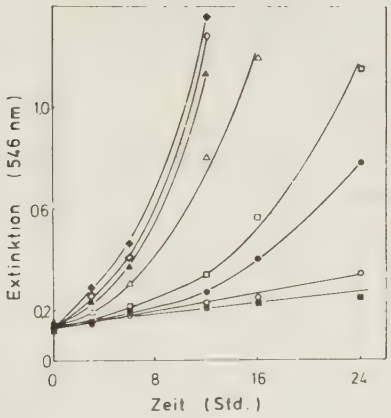


Abb. 10 Der Wuchsstoffbedarf der Mutante HF 106 ($Val^-$, $Ile^-$)

Jeweils 30 ml Mineral-Glucose-Lösung wurden mit 1 ml Bakteriensuspension beimpft. Den Ansätzen wurden die Aminosäuren Valin und Isoleucin in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt und bei 30° C inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen und die Extinktion der Bakteriensuspensionen bei 546 nm bestimmt.

| | | |
|---|---|---|
| 100 µM Valin | 500 µM Isoleucin | (■) |
| 250 µM Valin | 500 µM Isoleucin | (○) |
| 500 µM Valin | 500 µM Isoleucin | (△) |
| 750 µM Valin | 500 µM Isoleucin | (◆) |
| 750 µM Valin | 100 µM Isoleucin | (●) |
| 750 µM Valin | 250 µM Isoleucin | (□) |
| 750 µM Valin | 500 µM Isoleucin | (▲) |
| 750 µM Valin | 750 µM Isoleucin | (◇) |

Eine Charakterisierung der Leucin-Mutanten war durch Kreuzfütterungstests nicht möglich; bei Salmonella typhimurium war nachgewiesen worden, daß Zwischenprodukte des Biosyntheseweges von leucin-auxotrophen Mutanten zwar ausgeschieden und im Nährmedium angehäuft werden, aber von anderen Mutanten nicht als Supplement verwertet werden können (GROSS et al., 1963). Enzymatische Bestimmungen ergaben, daß alle Leucin-Mutanten über eine aktive IPM-Synthase verfügten. Folglich muß entweder die IPM-Isomerase oder die β-IPM-Dehydrogenase durch die Mutation geschädigt worden sein. Eine Übersicht über die isolierten Mutanten und ihre möglichen Enzymdefekte ist in Tab. 7 gegeben. Zum besseren Verständnis sind in Abb. 11 die Biosynthesewege der verzweigten Aminosäuren dargestellt.

Tab. 7 Das Wachstum der isolierten Mutanten mit verschiedenen Supplinen

| Wachstumsfaktor | Anzahl der Mutanten | vermutlicher Enzymdefekt |
|---|---|---|
| Isoleucin oder α-Aminobuttersäure | 5 | Threonin-Desaminase |
| Isoleucin und Valin | 31 | α-Acetohydroxysäure-Synthase |
| | 6 | ? |
| Leucin | 54 | IPM-Isomerase oder β-IPM-Dehydrogenase |
| Valin, Isoleucin und Leucin | 20 | α-Acetohydroxysäure-Synthase und IPM-Isomerase oder β-IPM-Dehydrogenase |

Die Klassifizierung der Mutanten erfolgte aufgrund des Wuchsstoffbedarfs; die angegebenen Supplemente mußten dem Mineral-Glucose-Agar zugesetzt werden, um Wachstum der Mutanten zu erzielen. Die Gruppe der isoleucin-valin-auxotrophen Mutanten ließ sich durch Kreuzfütterungstests in zwei Untergruppen aufteilen. Zur Charakterisierung wurde weiterhin im enzymatischen Test geprüft, ob die Mutanten über die Threonin-Desaminase, die α-Acetohydroxysäure-Synthase und die α-Isopropylmalat-Synthase verfügten.

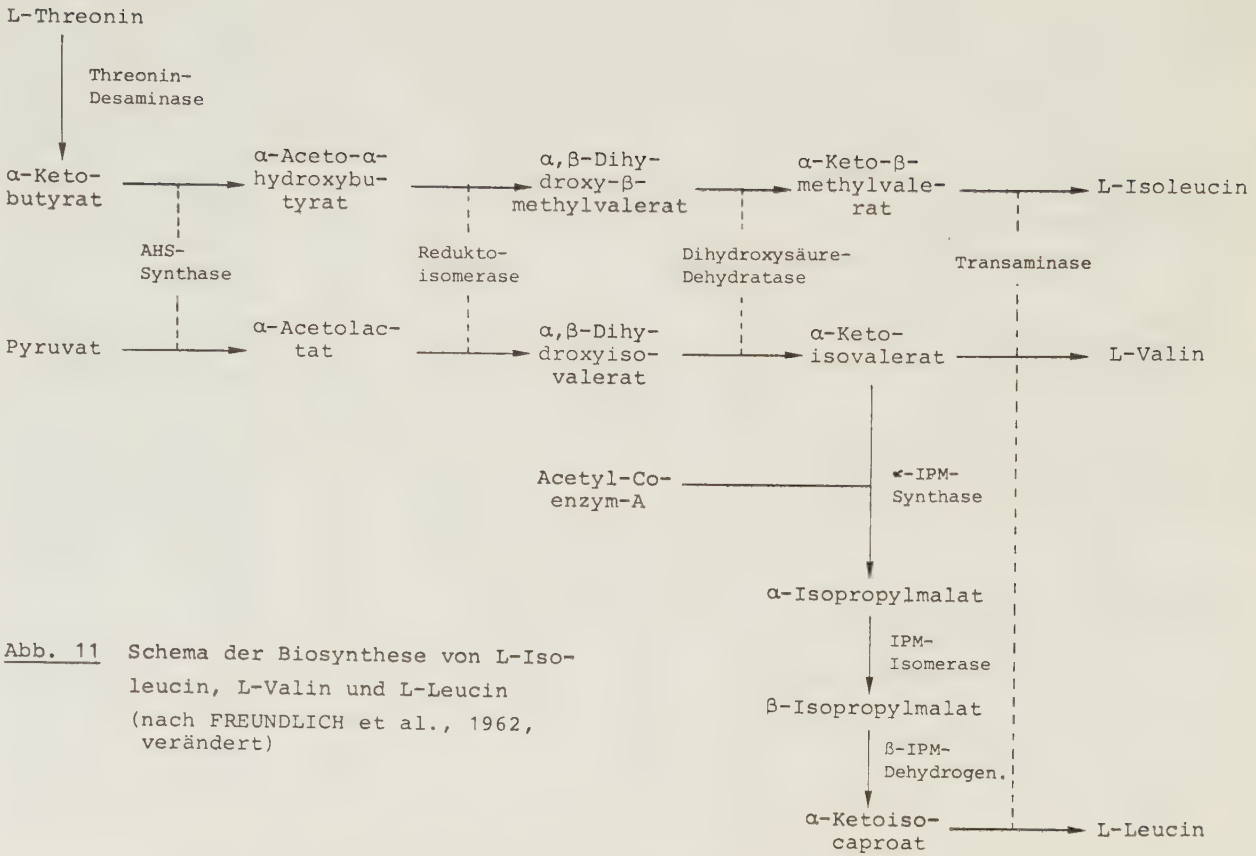


Abb. 11 Schema der Biosynthese von L-Isoleucin, L-Valin und L-Leucin (nach FREUNDLICH et al., 1962, verändert)

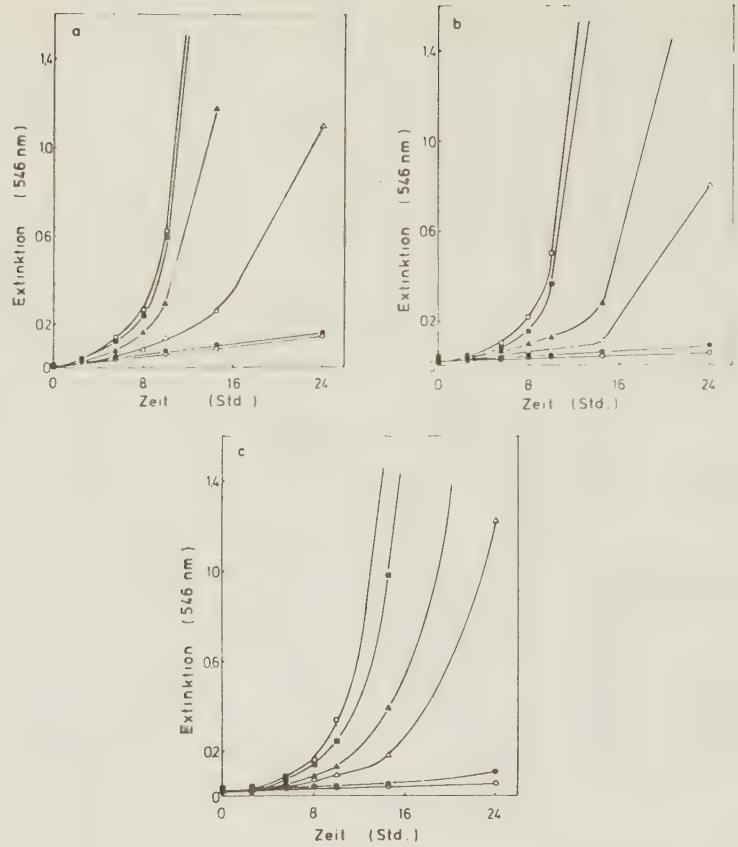


Abb. 12 Der Supplementbedarf der Mutante HF 144 ($Ile^-$, $Val^-$, $Leu^-$)

Der Bedarf der Mutante HF 144 für die Aminosäuren Isoleucin, Valin und Leucin wurde unter den in Abb. 10 angegebenen Bedingungen ermittelt. Jeweils zwei Aminosäuren wurden in Konzentrationen von 1 mM der Nährlösung zugesetzt. Die Konzentration der dritten Aminosäure wurde variiert; es wurden 50 (○), 100 (●), 200 (△), 300 (▲), 500 (■) und 750 (□) mM zugesetzt.

a) Abhängigkeit des Wachstums von der Isoleucin-Konzentration

b) Abhängigkeit des Wachstums von der Leucin-Konzentration

c) Abhängigkeit des Wachstums von der Valin-Konzentration

Ebenso konnte die IPM-Synthase in den Extrakten aller Doppelmutanten nachgewiesen werden; HILL (1968) hatte von Hydrogenomonas H 16 ebenfalls keine Mutanten mit inaktiver IPM-Synthase erhalten. Da die Doppelmutanten sich von der Mutante HF 106, die eine geschädigte AHS-Synthase aufwies, herleiteten, zeigten sie in der Biosynthese des Valins denselben Defekt.
Der Bedarf der Doppelmutante HF 144 für die Aminosäuren Isoleucin, Valin und Leucin ist in Abb. 12 wiedergegeben; jeweils zwei Aminosäuren wurden den Nährmedien in sättigenden Konzentrationen zugesetzt, die Konzentration der dritten wurde variiert. Optimale Wachstumsraten wurden erzielt, wenn 750 µM Valin, 500 µM Isoleucin und 500 µM Leucin zum Mineral-Glucose-Medium zugegeben wurden.

### 3.3.2 Die Aktivität der IPM-Synthase während des Wachstums der Mutante HF 144 unter Mangelbedingungen

Eine erhöhte Bildung der IPM-Synthase ist bei Hydrogenomonas H 16 durch Anzucht einer isoleucin-valin-bedürftigen Mutante unter Derepressionsbedingungen erreicht worden (HILL, 1968). Doch wies WIEGEL (1974) darauf hin, daß sich in den Kulturen unter Supplementbegrenzung häufig spontane Revertanten bildeten, die sich aufgrund ihres Wachstumsvorteils in der Population schneller vermehrten als die Mutanten und so zu unterschiedlich hohen Aktivitäten der IPM-Synthase in Zellen verschiedener Anzuchten führten. Um dieses zu vermeiden, wurde für die Anzucht unter Wachstumsbegrenzung durch die Aminosäuren eine Doppelmutante von M. denitrificans gewählt, die sowohl für Isoleucin und Valin als auch für Leucin auxotroph war: Bei gleichzeitigem Mangel an Valin und Leucin sollten die Revertanten, die eines der geschädigten Enzyme wieder funktionsfähig bilden, durch den zweiten Defekt dennoch im Wachstum durch Leucinmangel begrenzt sein und die IPM-Synthase dereprimiert bilden.
Aufgrund der relativen Stabilität der Enzymdefekte wurde für die Anzucht die Mutante HF 144 ($Ile^-$, $Val^-$, $Leu^-$) gewählt. In einer Reihe von Vorversuchen wurden Anzuchtbedingungen ermittelt, die sowohl eine hohe Aktivität der IPM-Synthase als auch eine gute

Zellausbeute gewährleisteten. In Abb. 13 ist der Wachstumsverlauf der Mutante mit 800 µM Isoleucin, 500 µM Valin und 300 µM Leucin wiedergegeben; gleichzeitig wurde das Auftreten von Revertanten in der Kultur verfolgt und die spezifische Aktivität der IPM-Synthase in verschiedenen Wachstumsstadien bestimmt.

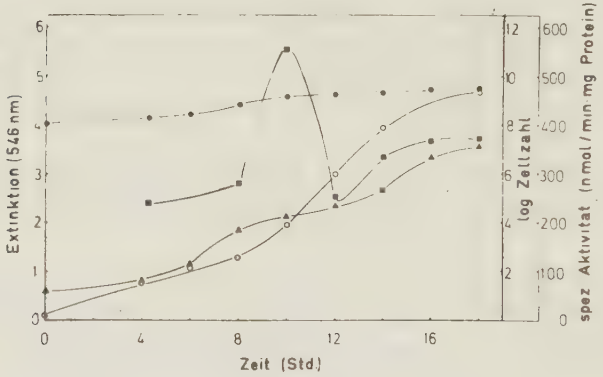


Abb. 13 Anzucht der Mutante HF 144 unter Derepressionsbedingungen

Eine Vorkultur der Mutante HF 144 ($Ile^-$, $Val^-$, $Leu^-$) wurde mit Supplementen (je 1 mM) angezogen und diente als Impfsuspension für die Anzucht im Braun-Fermenter. Das Mineral-Glucose-Medium (8 l) enthielt 800 µM Isoleucin, 500 µM Valin und 300 µM Leucin. Zu den angegebenen Zeiten wurden der Kultur Proben entnommen und die Extinktion bei 546 nm bestimmt. Weiterhin wurde die Gesamtzahl der Mutanten sowie die der valin-isoleucin-auxotrophen Revertanten bestimmt und die spezifische Aktivität der IPM-Synthase gemessen.

●—● Gesamtzahl der lebenden Zellen

○—○ Zahl der isoleucin-valin-auxotrophen Revertanten

▲—▲ Extinktion bei 546 nm

■—■ spezifische Aktivität der IPM-Synthase

## 3.4 Die Anreicherung der IPM-Synthase

Die spezifische Aktivität der IPM-Synthase aus M. denitrificans konnte zwar durch Anzucht der Mutante HF 144 unter Derepressionsbedingungen auf das 30 - 50fache der Aktivität, die der Wildtyp aufwies, erhöht werden, doch war für eine eingehendere Untersuchung des Enzyms eine weitere Anreicherung notwendig. Insbesondere sollten die begleitenden Enzyme, die einen direkten optischen Nachweis der IPM-Kondensation verhinderten, durch Fraktionierung des Extraktes abgetrennt werden. Ein Überblick über den Anreicherungsgang, der sich in einer Reihe von Vorversuchen als der güntigste erwies, ist in Abb. 20 gegeben. Die einzelnen Manipulationen sind in „Methoden" (Kap. 2.15) ausführlich beschrieben.

### 3.4.1 Anzucht, Lagerung und Aufschluß der Zellen

Um bei der Anreicherung des Enzyms stets von einheitlichem Zellmaterial mit hoher spezifischer Aktivität ausgehen zu können, wurde die Mutante HF 144 in einer 100 l-Kultur unter Derepressionsbedingungen angezogen. Aufgrund der Kürze der Wachstumsphase, in der die Zellen die relativ höchste Aktivität des Enzyms aufwiesen, war eine Ernte zu diesem Zeitpunkt nicht möglich. Sie erfolgte deshalb erst gegen Ende der zweiten logarithmischen Phase (vgl. Abb. 12); die Zellen wurden abzentrifugiert und dann bei $-20^{\circ}$ C gelagert.
Vergleichende Bestimmungen ergaben, daß das Einfrieren zwar einen Verlust von 20 % der Enzymaktivität mit sich brachte, doch blieb die Aktivität bei der Lagerung dann mehrere Monate nahezu gleich.
Zur Herstellung von Rohextrakten wurden die Zellen in Puffer aufgetaut und durch dreimalige Behandlung mit der French-Presse aufgeschlossen. Durch einstündige Zentrifugation bei 100 000 g wurden die Zelltrümmer aus der Suspension sedimentiert und verworfen. Die IPM-Synthase ließ sich nur im Überstehenden nachweisen und ist daher als „lösliches" Enzym anzusehen.

### 3.4.2 Stabilisierung der IPM-Synthase

Vergleichende Untersuchungen zeigten, daß das Enzym in einfachen Puffern äußerst instabil war; innerhalb von 20 Std. nahm die Aktivität des Enzyms in Rohextrakten mit $KPO_4$-Puffer (0,1 M; pH 6,8) um 66 %, mit Tris-HCl-Puffer (0,1 M; pH 7,5) sogar um 76 % ab. Während eine Erhöhung der Ionenstärke durch 0,1 M KCl in $KPO_4$-Puffer das Enzym nur gering stabilisierte, ließ sich durch Zugabe von 5 mM Valin der Aktivitätsverlust auf 50 % vermindern (Abb. 14).

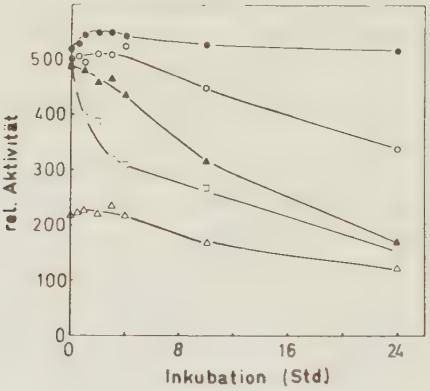


Abb. 14 Die Stabilisierung der IPM-Synthase in Rohextrakten durch Substrate und Effektoren

Zellen der Mutante HF 144 wurden in $KPO_4$-Puffer (0,1 M; pH 6,8) suspendiert und durch dreimalige Behandlung mit der French-Presse aufgeschlossen. Nach einstündiger Zentrifugation bei 100 000 g wurde das Überstehende aufgeteilt, den Rohextrakten sofort die angegebenen Effektoren zugesetzt und die Aktivität der IPM-Synthase bestimmt.

□—□ kein Zusatz
●—● Zusatz von 1 mM KIV
○—○ Zusatz von 5 mM Valin
△—△ Zusatz von 1 mM Leucin
▲—▲ Zusatz von 100 mM KCl

Eine gute Stabilisierung wurde durch Zusatz von 1 mM α-Ketoisovalerat, dem natürlichen Substrat des Enzyms erreicht: Die Aktivität des Enzyms stieg sogar um 5 % an und blieb dann über 20 Std. fast gleich hoch. In den folgenden Untersuchungen wurde den Extrakten deshalb stets 1 mM KIV und 5 mM Valin zugesetzt. Beim Einengen angereicherter Enzympräparate durch Ultrafiltration koagulierte das Enzymprotein und fiel aus der Lösung aus. Durch Zusatz von 5 % Glycerin zu den Extrakten wurde die IPM-Synthase soweit stabilisiert, daß eine Konzentration der Lösungen durch Ultrafiltration ohne große Aktivitätsverluste möglich war.

### 3.4.3 Versuche zur Fällung der Nucleinsäuren

Zur Fällung der Nucleinsäuren aus den Rohextrakten wurden Cethyltrimethylammoniumbromid, Streptomycinsulfat und Protaminsulfat in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Doch war eine direkte Abtrennung der Nucleinsäuren nicht möglich, da in allen Fällen das Enzym entweder ebenfalls präcipitiert oder inaktiviert wurde. Deshalb wurden die Extrakte mit einer Spatelspitze DNase und RNase versetzt und 15 min bei Raumtemperatur gehalten. Die starke Abnahme der Viskosität der Lösungen zeigte eine Aufspaltung der Nucleinsäuren in kleine Bruchstücke an, die sich durch die nachfolgende Gelfiltration weitgehend abtrennen ließen.

### 3.4.4 1. Gelfiltration mit Sephadex G 200

Da aufgrund hoher Aktivitätsverluste eine fraktionierte Ausfällung von Proteinen weder mit Ammoniumsulfat noch mit Polyäthylenglycol möglich war, wurde der Rohextrakt direkt auf eine Säule mit Sephadex G 200 gegeben und mit $KPO_4$-Puffer (0,1 M; pH 6,8; 1 mM KIV; 5 mM Valin) eluiert.
Das Gel wurde gewählt, weil es sowohl eine Abtrennung des Enzyms von voranlaufenden Poly-β-hydroxybuttersäure-Partikeln als auch von den nachfolgenden Nucleinsäure-Bruchstücken gewährleistete.
Die im Elutionsdiagramm (Abb. 15) angegebenen enzymhaltigen Fraktionen (75 - 102) wurden vereinigt und dem Eluat dann 5 % Glycerin zugesetzt.

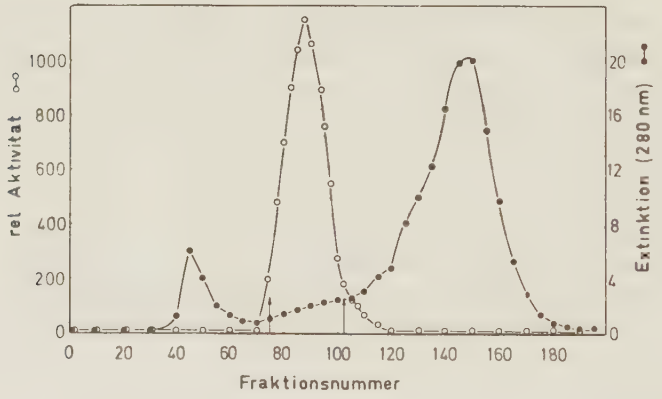


Abb. 15 Gelfiltration des Rohextraktes mit Sephadex G 200

Die Fraktionierung erfolgte in einer Säule mit Sephadex G 200 (Gelbett Ø 5 cm; Länge 55 cm), das gegen $KPO_4$-Puffer (0,1 M; pH 6,8; 1 mM KIV; 5 mM Valin) äquilibriert war. Der Rohextrakt (25 ml, 605 mg Protein) wurde aufgetragen und mit dem angegebenen Puffer eluiert. Das Volumen der aufgefangenen Fraktionen betrug ca. 6 ml.

o—o relative Aktivität der IPM-Synthase

●—● Absorption der Proteine und Nucleinsäuren bei 280 nm

Die Fraktionen 75 - 102 (Pfeile) wurden vereinigt und bei der nachfolgenden Chromatographie eingesetzt.

### 3.4.5 Chromatographie an Sephadex DE - A 50

Das „aktive" Eluat der Gelfiltration wurde direkt auf eine Säule mit Sephadex DE - A 50 gegeben, die gegen $KPO_4$-Puffer (0,1 M; pH 6,8; 1 mM KIV; 5 mM Valin; 5 % Glycerin) äquilibriert war. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0 - 500 mM KCl in diesem Puffer. Die Trennung wurde bei Raumtemperatur ( 22° C) durchgeführt, da sich gezeigt hatte, daß die IPM-Synthase, insbesondere in verdünnten Lösungen, kältelabil war ( vgl. 2.5.3). Das Enzym löste sich erst bei relativ hoher KCl-Konzentration (~300 mM) von dem Gel und wurde im letzten großen Proteinpeak nachgewiesen (Abb. 16). Die enzymhaltigen Fraktionen 150 - 170 wurden vereinigt und durch Ultrafiltration eingeengt. Obwohl die Ausbeute nur 56 % der eingesetzten Aktivität betrug, wurde mit diesem Schritt eine 3,5 - 4fache Anreicherung des IPM-Synthase erzielt.

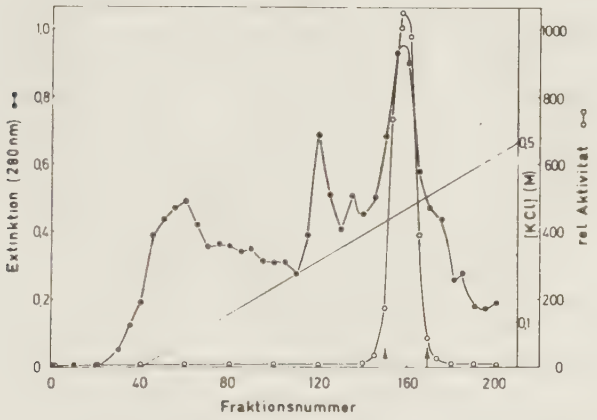


Abb. 16 Chromatographie an Sephadex DE - A 50

Zur Chromatographie wurde eine Säule mit Sephadex DE - A 50 verwendet. Das Gel (Ø 2,6 cm; Länge 30 cm) war gegen $KPO_4$-Puffer (0,1 M; pH 6,8; 1 mM KIV; 5 mM Valin; 5 % Glycerin) äquilibriert. Aufgetragen wurde das „aktive" Eluat der 1. Gelfiltration. Die Elution erfolgte mit einem linearen KCl-Gradienten von 0 - 500 mM im angegebenen Puffer; aufgefangen wurden 6 ml Fraktionen.

### 3.4.6 Chromatographie an DEAE-Cellulose

Die weitere Proteinfraktionierung erfolgte an DEAE-Cellulose in einer Säule (Gelbett Ø 1,5 cm; Länge 20 cm). Das Gel war gegen 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,5) mit 1 mM KIV, 5 mM Valin und 5 % Glycerin äquilibriert. Der Extrakt wurde durch Gelfiltration mit Sephadex G 25 ebenfalls auf diesen Puffer eingestellt, auf die Säule aufgetragen und mit einem linearen KCl-Gradienten von 0 bis 250 mM eluiert. Das Elutionsdiagramm (Abb. 17) zeigt einen breiten Proteinpeak, in dessen zweiter Hälfte die IPM-Synthase nachgewiesen wurde (Fraktionen 45 - 62). Es wurde zwar nur eine 1,2fache Anreicherung des Enzyms erzielt, doch war diese Fraktionierung notwendig, um in der nachfolgenden Chromatographie eine gute Auftrennung zu erreichen.

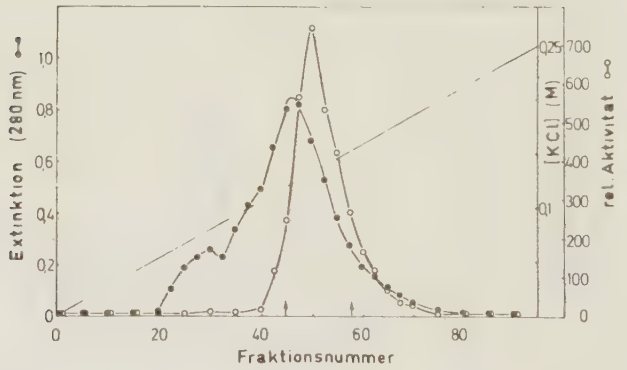


Abb. 17 Chromatographie an DEAE-Cellulose

Die Fraktionierung des Extraktes erfolgte in einer Säule mit DEAE-Cellulose (Gelbett Ø 1,5 cm; Länge 20 cm). Das Gel war gegen Tris-Puffer (0,1 M; pH 7,5; 1 mM KIV; 5 mM Valin; 5 % Glycerin) äquilibriert; die Elution wurde mit einem linearen KCl-Gradienten von 0 - 250 mM in diesem Puffer durchgeführt. Aufgefangen wurden Fraktionen mit einem Volumen von ca. 6 ml. Die „aktiven" Fraktionen 45 - 62 wurden gesammelt und durch Ultrafiltration eingeengt.

### 3.4.7 Chromatographie an Hydroxylapatit

Der Puffer des Extraktes wurde durch Gelfiltration mit Sephadex G 25 gegen 0,01 M $KPO_4$-Puffer (pH 6,8) mit Zusätzen von 1 mM KIV, 5 mM Valin und 5 % Glycerin ausgetauscht, und die Fraktionierung in einer Säule mit Hydroxylapatit Biogel HT (Gelbett Ø 1,5 cm; Länge 10 cm), die ebenfalls gegen den angegebenen Puffer äquilibriert war, durchgeführt. Die Elution erfolgte mit $KPO_4$-Puffer linear steigender Konzentration von 10 - 100 mM, der die angegebenen Zusätze enthielt.
Das Elutionsdiagramm (Abb. 18) zeigt, daß bei dieser Fraktionierung eine Separation der IPM-Synthase von den übrigen Proteinen erfolgte ; die Aktivität des Enzyms war der gemessenen Proteinkonzentration des letzten Peaks nahezu proportional.

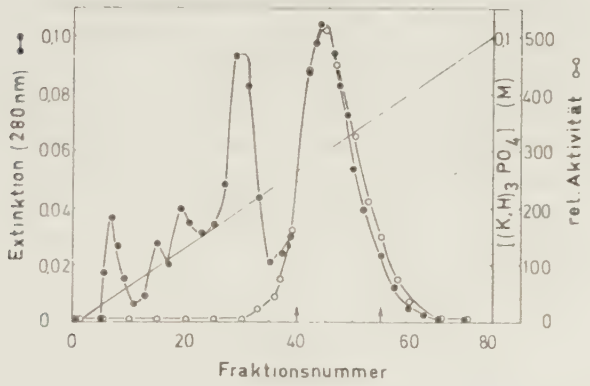


Abb. 18 Chromatographie an Hydroxylapatit

Der Extrakt wurde gegen $KPO_4$-Puffer (0,01 M; pH 6,8; 1 mM KIV; 5 mM Valin; 5 % Glycerin) äquilibriert und auf eine Säule mit Hydroxylapatit Biogel HT (Gelbett Ø 1,5 cm; Länge 10 cm), die ebenfalls mit diesem Puffer eingestellt war, aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem linearen $KPO_4$-Gradienten von 10 - 100 mM; aufgefangen wurden 6 ml Fraktionen. Das „aktive" Eluat (Fraktionen 40 - 55) wurde gesammelt und durch Ultrafiltration eingeengt.

Weiterhin konnten die unspezifischen Thioesterasen abgetrennt werden, die bisher einen Aktivitätsnachweis durch Bestimmung der Rate der Acetyl-CoA-Spaltung verhinderten. Die „aktiven" Fraktionen 40 - 55 wurden gesammelt und durch Ultrafiltration eingeengt; trotz hoher Aktivitätsverluste (60 %) wurde eine 1,4fache Anreicherung der IPM-Synthase erzielt.

### 3.4.8 Zweite Gelfiltration mit Sephadex G 200 superfine

In einigen Anreicherungsgängen wurde nach der Chromatographie an Hydroxylapatit eine erneute Gelfiltration mit Sephadex G 200 superfine durchgeführt. Sie erbrachte keine weitere Anreicherung der IPM-Synthase; aufgrund von Verlusten bei der Ultrafiltration durch Präcipitation des Proteins und Inaktivierung des Enzyms infolge starker Verdünnung nahm sowohl die Ausbeute als auch die spezifische Aktivität ab. Doch konnte gezeigt werden, daß trotz günstigerer Versuchsbedingungen gegenüber der 1. Gelfiltration (langes Gelbett, geringes Auftragsvolumen) keine weitere Fraktionierung des Extraktes erfolgte: Zwar lief an der Elutionsfront präcipitiertes Protein, doch war die Aktivität der IPM-Synthase nahezu proportional zur gemessenen Proteinkonzentration des nachfolgenden Peaks (Abb. 19).

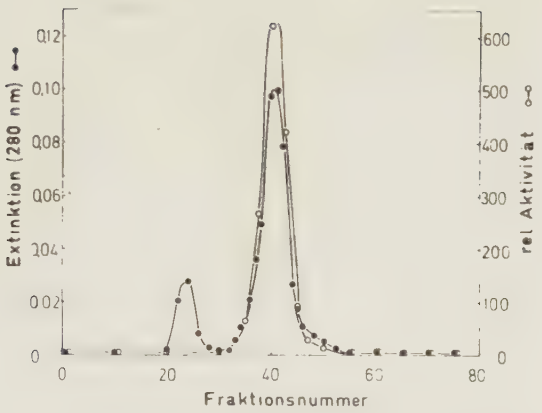


Abb. 19 2. Gelfiltration mit Sephadex G 200 superfine

Die Gelfiltration wurde in einer Säule (Gelbett Ø 2,5 cm; Länge 95 cm) mit Sephadex G 200 superfine durchgeführt. Das Gel war gegen $KPO_4$-Puffer (0,05 M; pH 6,8; 1 mM KIV; 5 mM Valin; 5 % Glycerin) äquilibriert. Die Elution erfolgte mit dem angegebenen Puffer, aufgefangen wurden 6 ml-Fraktionen. Die „aktiven" Fraktionen 36 - 45 wurden gesammelt und durch Ultrafiltration eingeengt.

Für einige der nachfolgenden Untersuchungen zur Charakterisierung des Enzymproteins wurden Proben aus der Fraktion mit der relativ höchsten Aktivität der IPM-Synthase direkt eingesetzt, um Effekte durch denaturiertes Protein weitgehend ausschließen zu können.

Eine Zusammenfassung der Anreicherungsschritte zur Reinigung der IPM-Synthase ist in Tab. 8 gegeben.

Für die meisten enzymkinetischen Messungen wurde die Enzymlösung nach der Chromatographie an Hydroxylapatit eingesetzt; die IPM-Synthase war darin 18,5fach angereichert. Einige Versuche wurden weiterhin mit einem nach FISCHER (1973) aus Wildtypzellen isolierten Enzym durchgeführt; obwohl es 67fach angereichert war, wies es eine erheblich geringere spezifische Aktivität (600 E/g Protein) als das aus der Mutante 18,5fach angereicherte Enzym (6 500 E/ g Protein) auf. Die verwendeten Enzymproben sind in den folgenden Untersuchungen stets angegeben.

Tab. 8 Anreicherung der IPM-Synthase

| Behandlung | Vol | Gesamt-aktivität | Gesamt-protein | spez. Aktivität | Ausbeute | Faktor der Anreicherung |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ml | E | mg | E/g | % | |
| Rohextrakt | 25 | 208 000 | 605 | 348 | 100 | 1 |
| Sephadex G 200 | 210 | 120 640 | 123 | 974 | 58 | 2,8 |
| DE-Sephadex A 50 | 4 | 66 560 | 17,7 | 3 758 | 32 | 10,8 |
| DEAE-Cellulose | 4,5 | 45 760 | 9,6 | 4 732 | 22 | 13,6 |
| Hydroxylapatit | 2 | 18 670 | 2,9 | 6 438 | 9 | 18,5 |
| Sephadex G 200 superfine | 2 | 12 500 | 2,1 | 5 960 | 6 | 16,9 |

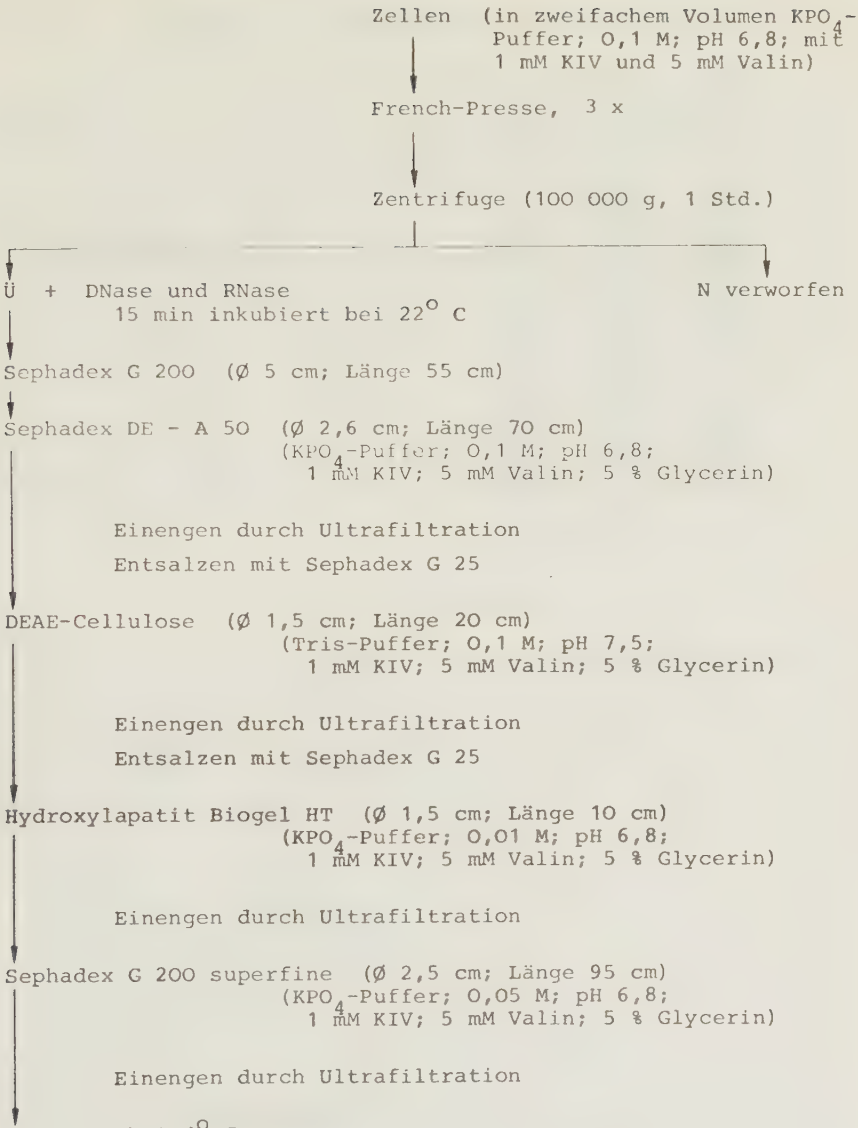


Abb. 20 Schema der Anreicherung der IPM-Synthase aus der Mutante HF 144 von Micrococcus denitrificans, Stamm Morris

## 3.5 Die Regulation der Aktivität der IPM-Synthase

Bei allen daraufhin untersuchten Organismen wird die Bildung der IPM-Synthase in der Zelle durch Repression und ihre Aktivität durch allosterische Endprodukthemmung gesteuert. Durch Untersuchungen an Rohextrakten zeigte HILL (1968), daß die durch Leucin bewirkte Aktivitätshemmung der Enzyme aus Hydrogenomonas H 16 und M. denitrificans durch Valin aufgehoben werden kann. Aktivitätsbestimmungen waren jedoch nur durch Endpunktbestimmung des gebildeten Produktes IPM möglich. Für eingehendere enzymkinetische Messungen war eine Abtrennung der Thioesterasen, die ein Verfolgen der Additionsreaktion durch Bestimmung des freigesetzten CoA-SH mit DTNB im optischen Test verhinderten, notwendig. Die folgenden Untersuchungen zur Charakterisierung der IPM-Synthase aus M. denitrificans wurden deshalb an gereinigten Enzympräparaten durchgeführt.

### 3.5.1 Analytische Gelelektrophorese

Als Kriterium für die Reinheit der IPM-Synthase nach der in Kap. 3.4 beschriebenen Anreicherung wurde die Auftrennung der Enzympräparate in der analytischen Disk-Gel-Elektrophorese herangezogen.
Als Enzymproben dienten die konzentrierten Eluate nach der DEAE-Cellulose- und der Hydroxylapatit-Chromatographie. Die Elektrophorese wurde wie unter „Methoden" (Kap. 2,16.1) beschrieben durchgeführt: Jeweils 20 µl der Extrakte wurden auf die Polyacrylamidgele aufgetragen und die Proteine bei einer Stromstärke von 2,5 mA/Röhrchen und einer Laufzeit von 1,5 Std. getrennt. Während das Enzympräparat nach der DEAE-Cellulose-Chromatographie bei der elektrophoretischen Auftrennung noch eine Schar von Proteinbanden zeigte, ließen sich nach weiterer Reinigung des Extraktes durch Chromatographie an Hydroxylapatit nur noch drei Banden nachweisen (Abb. 21).

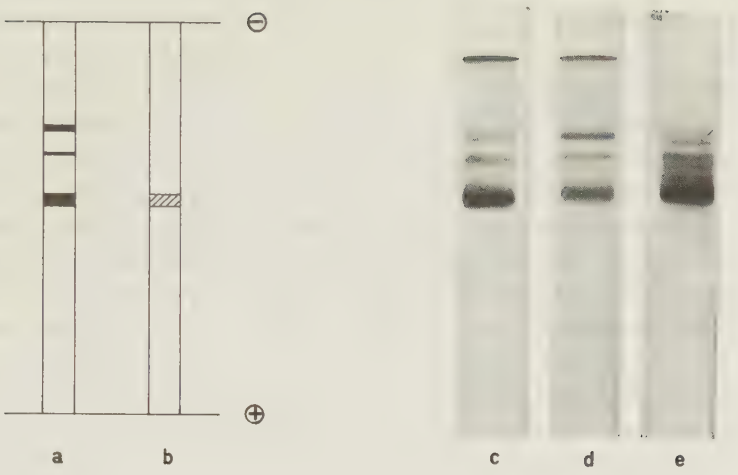


Abb. 21 Verteilung der Protein- und Aktivitätsbanden in der analytischen Disk-Gel-Elektrophorese

Die Elektrophorese wurde in dem Gelsystem nach MAURER (1968) in einer Trennkammer von SHANDON durchgeführt (s. „Methoden"). Die Stromstärke betrug 2,5 mA/Gelröhrchen (0,5 x 6,5 cm) bei einer Laufzeit von 1,5 Std.

a) Verteilung der Proteine nach Elektrophorese des konzentrierten Extraktes nach der Chromatographie an Hydroxylapatit (IPM-Synthase 18,5fach angereichert).
Die Proteinfärbung erfolgte mit Amidoschwarz.

b) Katalytisch aktive Bande, durch Farbreaktion analog dem optischen Test mit DTNB sichtbar gemacht.

c) Photo von a; die aufgetragene Probe enthielt 60 µg Protein.

d) Photo von a; die aufgetragene Probe enthielt 120 µg Protein.

e) Photo nach Elektrophorese des konzentrierten Extraktes der Chromatographie an DEAE-Cellulose (IPM-Synthase 13,6fach angereichert). Es wurden 10 µl Extrakt (~100 µg Protein) aufgetragen; die Färbung erfolgte mit Amidoschwarz.

Die IPM-Synthase wurde in den Gelen durch Nachweis der enzymatisch katalysierten Reaktion analog dem optischen Test bei 412 nm mit DTNB identifiziert:Wurden frische, nichtfixierte Gele in dem Testgemisch inkubiert, bildete das freigesetzte CoA-SH mit dem DTNB eine gelbe Zone aus, die sich photometrisch registrieren ließ (Abb. 22). Die Aufzeichnung mußte sofort nach Auftreten der Färbung erfolgen, da die gelbe Bande sich durch Diffusion des Farbstoffes schnell verbreiterte. Durch Markierung mit Hilfe eines feinen Drahtes und anschließender Proteinfärbung ließ die enzymatisch aktive Zone sich der am schnellsten gewanderten Proteinbande, die das meiste Protein enthielt, zuordnen. Die Lage der Proteinbanden sowie der katalytisch aktiven Zonen ist in Abb. 21 a,b graphisch wiedergegeben.

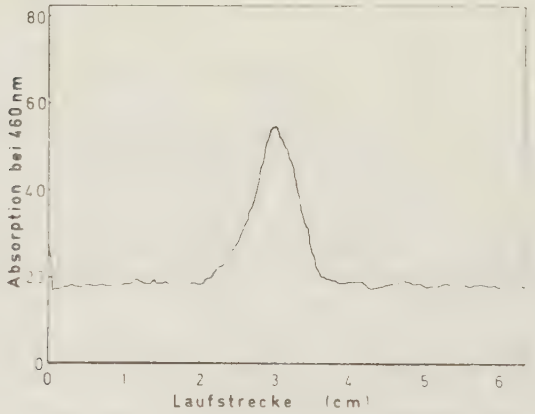


Abb. 22 Nachweis der Aktivität der IPM-Synthase nach Elektrophorese im Gel

Zur elektrophoretischen Trennung wurden 20 µl Extrakt (60 µg Protein) mit 18,5fach angereicherter IPM-Synthase eingesetzt. Nach 1,5 Std. Laufzeit bei einer Stromstärke von 2,5 mA/Röhrchen wurde das Gel 10 min im Testgemisch mit DTNB (s. „Methoden") inkubiert und die Absorption bei 465 nm dann sofort im Durchlichtverfahren mit einem Densitometer (Chromoscan) registriert.

### 3.5.2 Molekulargewichtsbestimmungen

#### 3.5.2.1 Gradientengel-Elektrophorese

Eine Auftrennung von Proteingemischen nach der Molekülgröße läßt sich durch Elektrophorese in Polyacrylamidgelen erreichen, die einen zunehmenden Vernetzungsgrad aufweisen (MARGOLIS und KENRICK, 1968). Die Proteinmoleküle wandern im elektrischen Feld, bis sie aufgrund der abnehmenden Porengröße in den Gelen an einer Ausschlußgrenze zurückgehalten werden. Bei linear steigendem Vernetzungsgrad sind die Wanderungsstrecken der Moleküle den Logarithmen ihrer Molekulargewichte in erster Näherung direkt proportional.
Für die Molekulargewichtsbestimmung der IPM-Synthase aus M. denitrificans HF 144 wurden Proben des konzentrierten Eluats der zweiten Gelfiltration mit Sephadex G 200 eingesetzt. Die Durchführung der Elektrophorese ist unter „Methoden" (Kap. 2.16.2) beschrieben. Die auf die Gele aufgetragenen Proben enthielten ~100 µg Protein; die Trennung wurde zunächst 1 Std. bei einer Spannung von 100 V, dann 23 Std. bei 200 V durchgeführt. Als Referenzprotein wurde den Proben Rinderserumalbumin zugesetzt, dessen Moleküle unter den Bedingungen der Elektrophorese Mono-, Di-, Tri- und Tetramere mit einem Molekulargewicht von 67 000, 137 000, 301 000 und 368 000 Dalton bilden.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung des Extraktes mit der 17fach angereicherten IPM-Synthase wurde das Enzym in den Gelen durch Nachweis der katalytischen Aktivität mit DTNB identifiziert und die Lage der aktiven Zone densitometrisch registriert (Abb. 23a). Durch anschließende Proteinfärbung mit Coomassie Blue wurden 9 Proteinbanden nachgewiesen (Abb. 23b und Abb. 24a). Durch Markierung ließ sich die enzymatisch aktive Zone einer Proteinbande zuordnen.
Wurde den Proben als Referenzprotein 50 µg Rinderserumalbumin zugesetzt (Abb. 24b), ergab die Auftragung der Wanderungsstrecken des Albumins gegen die Logarithmen der bekannten Molekulargewichte eine Gerade.

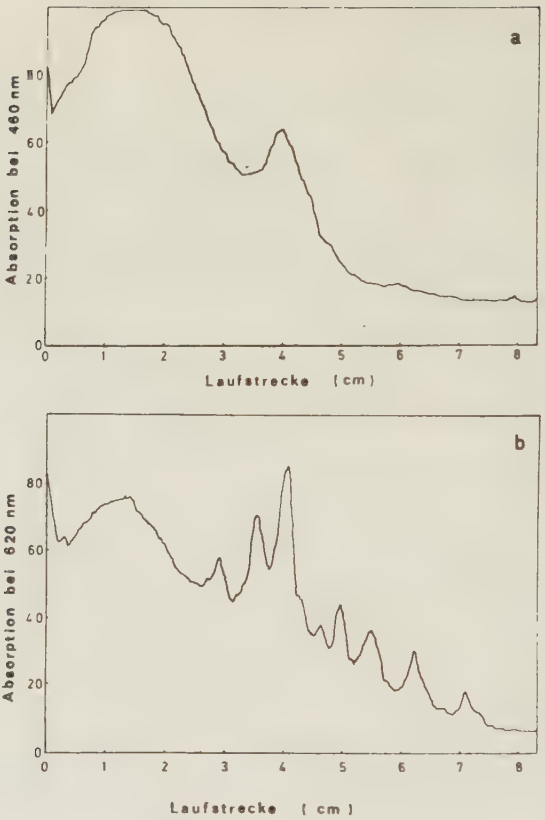


Abb. 23 Densitogramm eines Elektrophoreselaufes mit 17fach angereicherter IPM-Synthase im Porengrößegradientengel

100 µl des nach der 2. Gelfiltration konzentrierten Extraktes wurden auf die Gradientengele aufgetragen (0,6 x 10 cm) und die Trennung des Proteins (100 µg) zunächst 1 Std. bei einer Spannung von 100 V, dann 23 Std. bei 200 V durchgeführt. Durch 10 min Inkubation des Gels im Reaktionsgemisch mit DTNB (s. „Methoden") wurde die katalytisch aktive Zone gelb gefärbt und sofort die Absorption des Gels bei 460 nm im Densitometer (Chromoscan) gemessen. Anschließend wurden die Proteine durch Coomassie Brilliant Blue angefärbt und die Absorption des Gels bei 620 nm bestimmt. Die steigende Basislinie der Densitogramme ist durch Trübung des Gels im gering vernetzten Bereich bedingt.

a) Densitogramm nach Färbung der katalytisch aktiven Zone analog dem DTNB-Test

b) Densitogramm nach Färbung der Proteine mit Coomassie Brilliant Blue

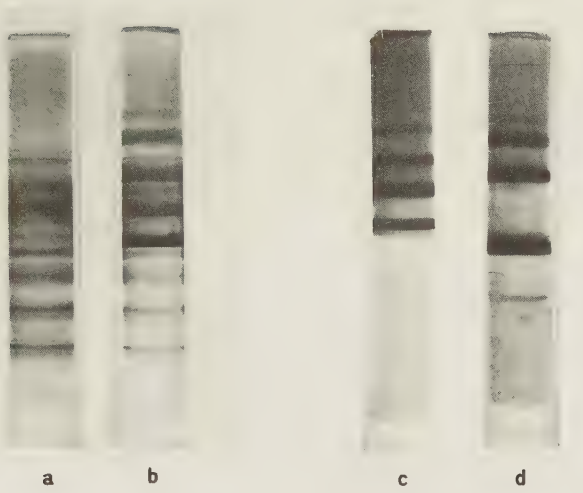


Abb. 24 Gradientengel-Elektrophorese der IPM-Synthase

Die Elektrophorese wurde wie in der Legende zu Abb. 23 angegeben durchgeführt. Die Färbung der Proteine erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue.

a) Trennung der Proteine (100 µg) eines Extraktes mit 17fach angereicherter IPM-Synthase.

b) wie a; der aufgetragenen Probe wurden jedoch 50 µg Rinderserumalbumin zugesetzt.

c) Reelektrophorese; aufgetragen wurde mazeriertes Gel mit aktiver IPM-Synthase aus drei unbehandelten Parallelansätzen von a mit 50 µg Rinderserumalbumin.

d) wie c; doch wurde die IPM-Synthase aus den mazerierten Gelscheiben eluiert und der Extrakt (250 µl) aufgetragen.

Die Molekulargewichte der unbekannten Proteine ließen sich nach Ausmessen der jeweiligen Wanderungsstrecken graphisch ermitteln; für die enzymatisch aktive Bande wurde ein Molekulargewicht von 94 000 Dalton bestimmt (Abb. 25).

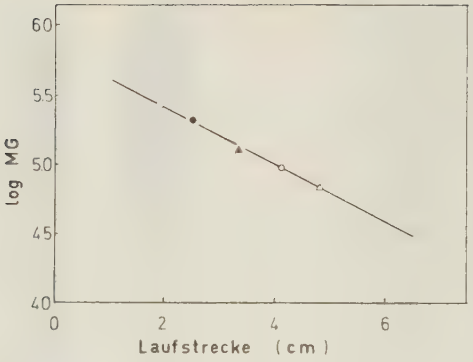


Abb. 25 Molekulargewichtsbestimmung der IPM-Synthase durch Gradienten-Elektrophorese

In dem in Abb. 24b dargestellten Gel wurden die Laufstrecken der Mono- (△), Di- (▲), Tri- (●) und Tetramere (□) ausgemessen und gegen die Logarithmen der bekannten Molekulargewichte aufgetragen. Die katalytisch aktive Bande war im DTNB-Test identifiziert worden; durch Ausmessen ihrer Laufstrecke wurde mit Hilfe der Referenzproteine für die IPM-Synthase (○) ein Molekulargewicht von 94 000 bestimmt.

In Tab. 9 ist eine Übersicht über Laufstrecken und Molekulargewichte aller getrennten Proteine gegeben. Während bei der Gelfiltration mit Sephadex G 200 nur ein Proteinpeak eluiert wurde, in dem die Aktivität der IPM-Synthase nahezu proportional zu gemessenen Proteinkonzentrationen war, wurde das Eluat durch Disk-Elektrophorese bereits in drei Banden aufgetrennt (vgl. Abb. 19 und Abb. 21). Durch die Elektrophorese in den Porengrößengradienten-Gelen erfolgte eine weitere Aufteilung in 9 Banden, für die große Unterschiede in den Molekulargewichten bestimmt wurden. Das läßt vermuten, daß durch diese Elektrophorese Polymere einzelner Proteine oder aber Untereinheiten getrennt werden. Für das katalytisch aktive Protein der IPM-Synthase wurde ein Molekulargewicht von 94 000 Dalton bestimmt; außerdem wurden Banden erhalten, die ein Molekulargewicht von 47 000 und 23 500 aufweisen.

Tab. 9 Molekulargewichtsbestimmung der IPM-Synthase und der begleitenden Proteine

| Referenz-protein Albumin | Proteine aus dem aufgetragenen Extrakt | Lauf-strecke (cm) | bekanntes MG | graphisch bestimmtes MG |
|---|---|---|---|---|
| Tetramer | | 1,8 | 368 000 | |
| Trimer | | 2,5 | 301 000 | |
| | 1. Bande | 2,85 | | 170 000 |
| Dimer | | 3.35 | 134 000 | |
| | 2. Bande | 3,6 | | 119 000 |
| | 3. Bande | 4,1 | | 94 000 |
| | 4. Bande | 4,3 | | 85 000 |
| | 5. Bande | 4,6 | | 75 000 |
| Monomer | | 4,8 | 67 000 | |
| | 6. Bande | 5,0 | | 61 000 |
| | 7. Bande | 5,5 | | 47 000 |
| | 8. Bande | 6,25 | | 34 000 |
| | 9. Bande | 7,05 | | 23 500 |

Um zu prüfen, ob die IPM-Synthase durch Gradientengel-Elektrophorese in Untereinheiten zerfällt, wurde eine Reelektrophorese mit dem Enzym durchgeführt.
Nach der ersten Auftrennung des eingesetzten Extraktes wurde in einem Gel die katalytisch aktive Zone identifiziert. Da die Proteinbanden die Gele trübten, ließen sich die entsprechenden Banden in weiteren sechs Gelen erkennen. Sie wurden herausgeschnitten und die Gelscheiben mit einem Glasstab mazeriert. Aus einem Teil des Gelbreies wurde das Protein nach 24 Std. Inkubation mit 250 µl Puffer extrahiert und erneut auf ein Gradientengel aufgetragen, der andere Teil des Breies wurde direkt auf ein weiteres Gel gegeben. Nach erneuter Elektrophorese ließ sich in dem Gel mit dem extrahierten Protein als Probe außer dem zugesetzten Albumin nur eine inaktive Proteinbande mit dem Molekulargewicht 47 000 nachweisen, während nach Auftragung des mazerierten Gels eine katalytisch aktive Proteinbande mit dem Molekulargewicht

94 000 erhalten wurde. Das läßt die Schlußfolgerung zu, daß die IPM-Synthase zumindest aus zwei Untereinheiten besteht. Es ist jedoch möglich, daß weitere Untereinheiten in den durchgeführten Trennungen aufgrund der äußerst geringen Proteinkonzentrationen nicht nachweisbar waren.

### 3.5.2.2 Gelfiltration mit Sephadex G 200

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes der IPM-Synthase wurde weiterhin eine Gelfiltration des Enzyms mit Sephadex G 200 durchgeführt. Grundlage der Methode ist die behinderte Diffusion des Proteins in der Gelmatrix; zwar ist die Wanderungsgeschwindigkeit auch von der Form der Moleküle abhängig, doch wird sie weitgehend vom Molekulargewicht bestimmt. Mit Hilfe von Referenzproteinen bekannten Molekulargewichtes läßt sich das unbekannte Molekulargewicht eines Proteins durch Auftragung des Elutionsvolumens gegen den Logarithmus des Molekulargewichtes ermitteln (ANDREWS, 1962).
Die Bestimmung wurde mit 18,5fach angereicherter IPM-Synthase durchgeführt, als Referenzproteine wurden Ferritin (MG = 540 000), Katalase (MG = 240 000). Aldolase (MG = 147 000), Rinderserumalbumin (MG = 67 000) und Cytochrom c (MG = 12 500) zugesetzt.
Die IPM-Synthase wurde zwischen der Aldolase und dem Rinderserumalbumin eluiert (Abb. 26). Die Auftragung der Elutionsvolumina gegen die Logarithmen der bekannten Molekulargewichte gibt eine lineare Beziehung wieder; für die IPM-Synthase wurde graphisch ein Molekulargewicht von 96 000 ermittelt (Abb. 27). Es steht in relativ guter Übereinstimmung mit dem durch Gradientengel-Elektrophorese bestimmten Molekulargewicht von 94 000.

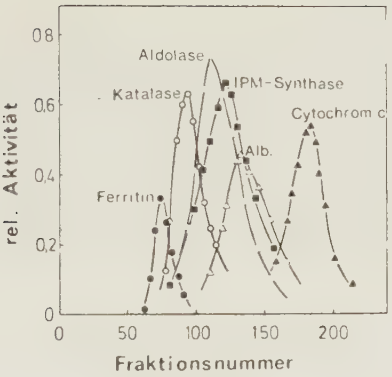


Abb. 26 Elutionsdiagramm eines Gemisches aus Referenzproteinen und der IPM-Synthase nach Gelfiltration mit Sephadex G 200

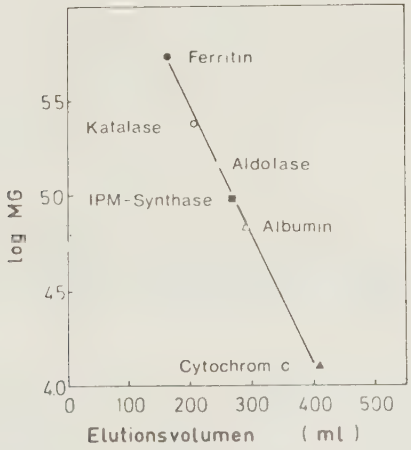


Abb. 27 Molekulargewichtsbestimmung der IPM-Synthase durch Gelfiltration mit Sephadex G 200

### 3.5.3 Kältelabilität

Da die meisten Enzyme in der Kälte stabil sind (DIXON und WEBB, 1964), wurden die Vorversuche zur Anreicherung der IPM-Synthase bei niederen Temperaturen ($0^{o}$ - $6^{o}$ C) durchgeführt. Doch traten bei der Fraktionierung der Extrakte stets hohe Aktivitätsverluste auf. Wurden die Enzympräparate anschließend bei Raumtemperatur gehalten, stieg die spezifische Aktivität über mehrere Tage langsam wieder an.

Über eine Kältelabilität der IPM-Synthase ist bisher nur für das Enzym aus Hydrogenomonas H 16 berichtet worden (WIEGEL, 1974); da bei Austausch des $H_2O$ gegen $D_2O$, das die hydrophoben Wechselwirkungen in Proteinlösungen verstärkt (LEE und BERN, 1968), das Enzym stabilisiert wurde, lassen sich die Aktivitätsverluste bei niederen Temperaturen vermutlich auf eine Änderung der Tertiärstruktur des Enzymproteins zurückführen.

Die Faltung der Aminosäureketten zu einer katalytisch aktiven Konfiguration des Enzymproteins wird durch Disulfidbrücken sowie hydrophilen und hydrophoben Wechselwirkungen der Aminosäurereste bestimmt. Während die kovalenten Bindungen der Disulfidbrücken relativ stabil sind, ist die Intensität der polaren und apolaren Wechselwirkungen weitgehend von der Temperatur und dem Ionenmilieu abhängig. Hydrophile Bindungen, insbesondere Wasserstoffbrückenbindungen, sind bei niederen Temperaturen und niederen Ionenstärken stabil, hydrophobe Wechselwirkungen werden dagegen durch hohe Temperaturen und Ionenstärken begünstigt.

Um die Aktivität der Proteasen in den Zellextrakten zu vermindern, wurde die erste Fraktionierung zur Anreicherung der IPM-Synthase aus M. denitrificans in der Kälte durchgeführt. Daher war eine Stabilisierung der katalytisch aktiven Proteinstruktur notwendig. Vergleichende Untersuchungen mit der 18,5fach angereicherten IPM-Synthase ergaben, daß das Enzym bei Raumtemperatur relativ stabil war, bei $0^{o}$ C jedoch schnell an Aktivität verlor (Abb. 28,

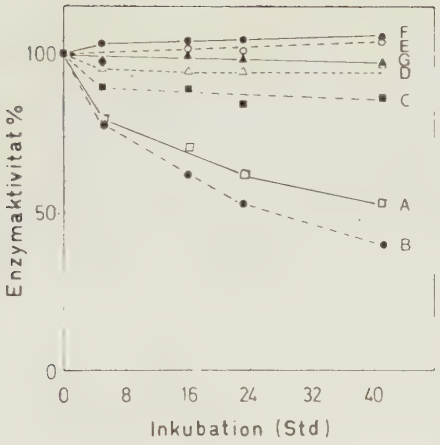


Abb. 28 Stabilisierung der kältelabilen IPM-Synthase durch Substrate und Effektoren bei $0^{\circ}$ C

Gereinigte IPM-Synthase wurde in 0,05 M $KPO_4$-Puffer (pH 6,8) mit den angegebenen Substraten und Effektoren bei $0^{\circ}$ C im Eisbad inkubiert und die Aktivität des Enzyms zu verschiedenen Zeiten im DTNB-Test bestimmt.

A: kein Zusatz, Inkubation bei $0^{\circ}$ C
B: Inkubation mit 250 mM KCl " "
C: " " 1 mM Leucin " "
D: " " 5 mM Valin " "
E: " " 1 mM KIV " "
F: " " 1 mM KIV bei Raumtemperatur
G: kein Zusatz, Inkubation bei Raumtemperatur

Kurven A, G). Während bei Zusatz von 250 mM KCl in der Kälte die Aktivität wider Erwarten noch schneller abnahm (Kurve B), ließ sich das Enzym durch die Effektoren Leucin und Valin, insbesondere aber durch das Substrat KIV, weitgehend stabilisieren (Kurven C, D, F).

### 3.5.4 pH-Optimum

Die Aktivität der IPM-Synthase ist sowohl vom pH als auch von der Art des Puffers abhängig (Abb. 29). Unter den angegebenen Bedingungen lag das Maximum der IPM-Bildung in Diäthylamin-HCl-Puffer bei pH 9,5. Während die spezifische Aktivität des Enzyms in Tris-HCl-Puffer und Diäthylamin-HCl-Puffer nur geringe Unterschiede aufwies, wurden in $KPO_4$-Puffer gleich hohe Reaktionsraten bereits bei einem niedrigeren pH erreicht.

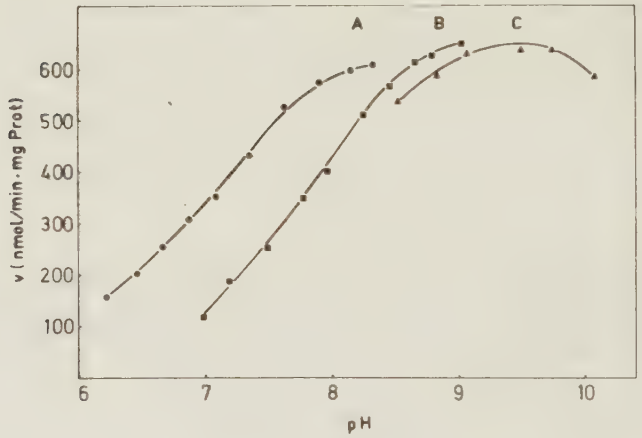


Abb. 29 Die Abhängigkeit der Aktivität der IPM-Synthase vom pH

Die Aktivitätsbestimmung wurde im fluorimetrischen Test durchgeführt; die Ansätze hatten die unter „Methoden" (Kap. 2.12.1) angegebene Zusammensetzung. Als Puffer wurden jedoch verwendet

A: $KPO_4$

B: Tris-HCl

C: Diäthylalamin-HCl

Die Puffer waren mit einer Glaselektrode auf den jeweiligen pH-Wert eingestellt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 19 µg Protein eines Extraktes mit 67fach angereicherter IPM-Synthase (nach FISCHER, 1973) gestartet und 15 min bei 37° C im Wasserbad inkubiert.

### 3.5.5 Temperaturoptimum

Um die Abhängigkeit der durch die IPM-Synthase katalysierten Reaktion zu ermitteln, wurde die Aktivität des Enzyms bei verschiedenen Temperaturen im fluorimetrischen Test bestimmt. Die Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Inkubationstemperatur zeigt, daß die optimale Geschwindigkeit der IPM-Bildung bei einer Temperatur von 42° C erreicht wurde (Abb. 30a). Die erhebliche Verminderung der IPM-Kondensation bei höheren Temperaturen ist auf eine Hitzedenaturierung des Enzyms zurückzuführen.

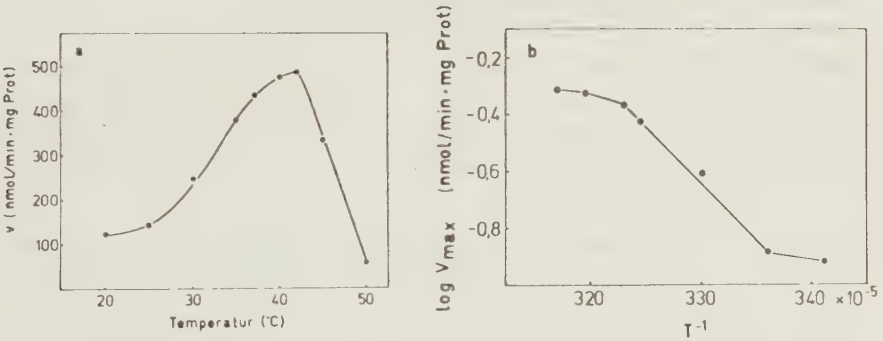


Abb. 30 Temperaturoptimum der IPM-Synthase (a) und dazugehörige Arrhenius-Auftragung (b) zur Ermittlung der Arrhenius-Konstanten $E_A$

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im fluorimetrischen Test (s. „Methoden", Kap. 2.12.1); jedoch wurde die Inkubationstemperatur wie angegeben variiert. Als Enzymprobe wurde ein Extrakt mit 67fach angereicherter IPM-Synthase (nach FISCHER, 1973) eingesetzt.

In der Arrhenius-Auftragung (log $v_{max}$ gegen 1/T) der Temperaturabhängigkeit der Reaktion läßt sich aus der Steigung der Kurve im linearen Bereich die Arrhenius-Konstante $E_A$ ermitteln (Abb. 30b). Für die IPM-Bildung wurde sie im Bereich zwischen $25^{o}$ C und $37^{o}$ C mit 18 300 cal/mol bestimmt. Da nach DIXON und WEBB (1964) $E_A = H + RT$ ist, ergibt sich für die IPM-Kondensation im vorliegenden System eine Aktivierungsenergie H von 17,7 kcal/mol.
Die Aktivierungsenergie der enzymatisch katalysierten Reaktion ist relativ hoch, so daß das Enzym nur als schlechter Katalysator der irreversiblen IPM-Kondensation anzusehen ist.

### 3.5.6 Substrat-Geschwindigkeits-Beziehungen

Da die IPM-Synthase die Addition von zwei Substraten katalysiert, war für die einzelnen Substrate eine getrennte Aufnahme der Sättigungskurven erforderlich. In den Testansätzen wurde jeweils ein Substrat variiert und das andere konstant gehalten.

#### 3.5.6.1 Bestimmung der Substratsättigung für α-Ketoisovalerat

Die Substratsättigung für α-Ketoisovalerat wurde bei verschiedenen Acetyl-CoA-Konzentrationen durchgeführt. Die Konzentration an KIV wurde im Bereich von 5 µM bis 250 µM variiert. Die Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit gegen steigende Substratkonzentrationen ergab eine hyperbolische Kurve (Abb. 31a); die Reaktion folgte der normalen Michaelis-Menten-Kinetik. In der Lineweaver-Burk-Auftragung (1/v gegen 1/s) wurde graphisch ein $K_m$-Wert von $2,8 \times 10^{-5}$ ermittelt (Abb. 31b). Die Affinität des KIV zum Enzym war unabhängig von der Konzentration des Substrates Acetyl-CoA.

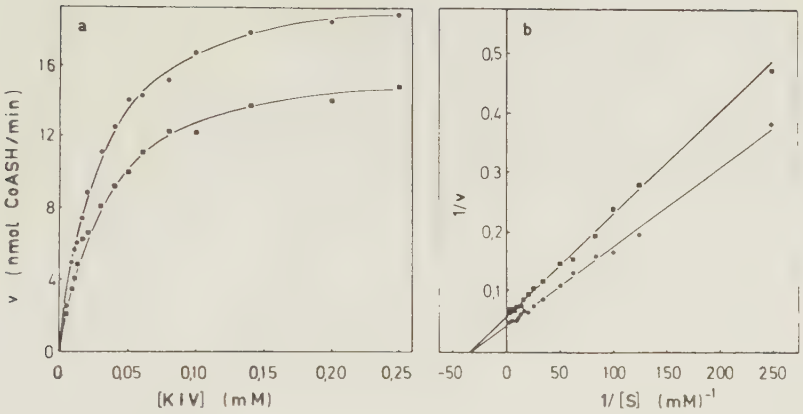


Abb. 31 Die Abhängigkeit der Aktivität der IPM-Synthase von der Substrat (KIV)-Konzentration

a) Substrat (KIV)-Sättigungskurve

Die Bestimmung der Aktivität erfolgte im optischen Test mit DTNB bei 412 nm. Das Reaktionsgemisch enthielt in 1 ml Endvolumen: 250 µmole Tris-HCl (pH 8,0), 250 µmole KCl, 1 µmol DTNB, 1,5 µmole bzw. 0,75 µmole Acetyl-CoA; KIV wie in der Abb. angegeben; gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von 4,8 µg Protein eines ca. 18fach angereicherten Enzympräparates.

●—● Acetyl-CoA-Konzentration 1,5 mM

■—■ Acetyl-CoA-Konzentration 0,75 mM

b) Lineweaver-Burk-Auftragung zu Abb. a

### 3.5.6.2 Bestimmung der Substratsättigung für Acetyl-CoA

Zur Aufnahme der Sättigungskurve für Acetyl-CoA wurde das Substrat im Bereich von 0,03 mM bis 1,5 mM variiert. Die Auftragung der Reaktionsrate gegen steigende Acetyl-CoA-Konzentrationen zeigt ebenfalls einen hyperbolischen Kurvenverlauf (Abb. 32a). Aus der Lineweaver-Burk-Auftragung wurde ein $K_m$-Wert von $0,1 \times 10^{-4}$ bestimmt. Die Sättigung des Enzyms für Acetyl-CoA war unabhängig von der eingesetzten Konzentration des Substrates KIV.

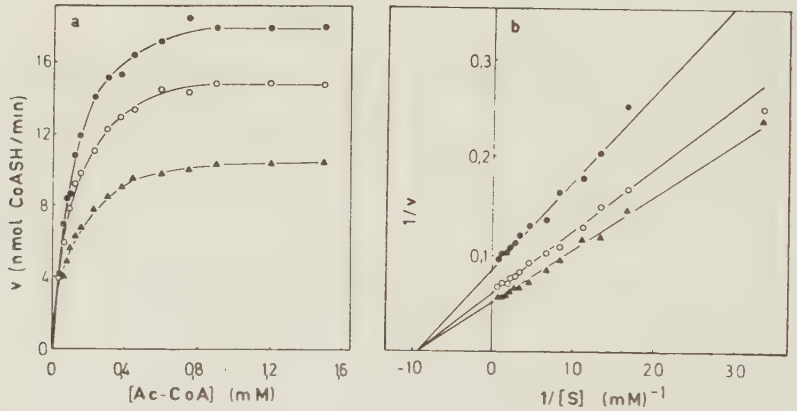


Abb. 32 Die Abhängigkeit der Aktivität der IPM-Synthase von der Substrat (Acetyl-CoA)-Konzentration

a) Substrat (Acetyl-CoA)-Sättigungskurve

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte wie in Abb. 31 angegeben, jedoch wurde die Konzentration an Acetyl-CoA variiert. Die Testreihen wurden bei verschiedenen Konzentrationen an KIV durchgeführt.

●—● 2,0 mM KIV
○—○ 0,2 mM KIV
▲—▲ 0,02 mM KIV

b) Lineweaver-Burk-Auftragung zu Abb. a

### 3.5.6.3 Substratbindungsstellen

Wurden die Daten der Substratsättigungskurven in der Hill-Auftragung (log $\frac{v}{V-v}$ gegen log S) dargestellt, ergaben sich Geraden, deren Anstieg n als Maß für die gegenseitige Beeinflussung der bindenden Zentren gilt. Die Sättigungskurve für Acetyl-CoA wies in dieser Auftragung über den gesamten Bereich einen Anstieg von n = 1,05 auf (Abb. 33a). Die Kurve der KIV-Sättigung ließ sich in zwei Abschnitte gliedern, die einen Anstieg von n = 0,89 bei niederen und von n = 0,46 bei hohen Substratkonzentrationen zeigten (Abb. 33b). Da die Hill-Koeffizienten mit n =<1 sehr niedrig lagen, ließen sich keine Rückschlüsse auf die Zahl der Substratbindungsstellen ziehen.

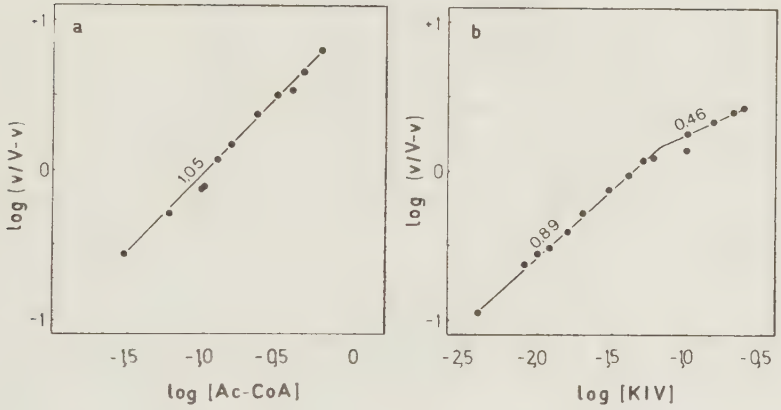


Abb. 33 Substratsättigung der IPM-Synthase für Acetyl-CoA und KIV

a) Substrat (Acetyl-CoA)-Sättigungskurve in der Hill-Auftragung. Daten wie in Abb. 32. KIV-Konzentration 2 mM.

b) Substrat (KIV)-Sättigungskurve in der Hill-Auftragung. Daten wie in Abb. 31. Acetyl-CoA-Konzentration 1,5 mM.

### 3.5.7 Die Inaktivierung der IPM-Synthase durch das Produkt CoA-SH

Bei der Aktivitätsbestimmung der IPM-Synthase im optischen Test mit DTNB verlief die Farbausbildung zwar einige Minuten linear, doch wurde sie dann zunehmend bis zum Stillstand gehemmt. Erneute Zugabe von Extrakt oder anderen Komponenten des Testansatzes bewirkten keine Fortsetzung der Reaktion.
Vergleichende Untersuchungen ergaben, daß das bei der enzymatischen Reaktion freigesetzte Produkt CoA-SH die IPM-Synthase inaktiviert.

Wurde das Enzym mit 0,05 mM CoA-SH inkubiert, nahm die Aktivität innerhalb von 20 min bereits um 80 % ab, nach zweistündiger Inkubation wurde ein Aktivitätsverlust von 90 % bestimmt (Abb. 34).

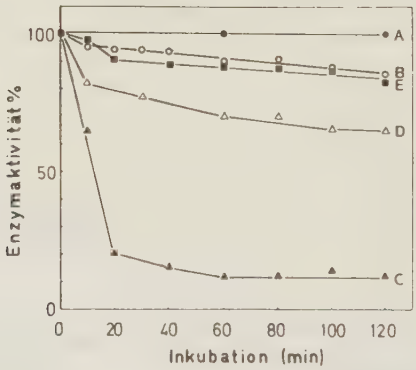


Abb. 34 Die Inaktivierung der IPM-Synthase durch CoA-SH

Enzympräparate mit ca. 18fach angereicherter IPM-Synthase wurden bei Raumtemperatur in 100 mM $KPO_4$-Puffer (pH 6,8) mit den unten aufgeführten Zusätzen inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurde die Aktivität des Enzyms im fluorimetrischen Test bestimmt. Die Enzymaktivität ist in Prozenten des Kontrollansatzes zum Zeitpunkt 0 angegeben.

A: Kontrolle, kein Zusatz
B: 5 µM CoA-SH
C: 50 µM CoA-SH
D: 50 µM CoA-SH; 5 mM Valin
E: 50 µM CoA-SH; 1 mM KIV

Das Enzym ließ sich weder durch Substrate noch durch Effektoren reaktivieren. Wurde die IPM-Synthase dagegen in Anwesenheit von Valin oder KIV mit CoA-SH inkubiert, schützten die Substanzen das Enzym weitgehend; mit 5 mM Valin wurden nach 2 Std. noch 65 %, mit 1 mM KIV noch 85 % der eingesetzten Aktivität nachgewiesen.
Da CoA-SH bereits bei niederen Konzentrationen (5 µM - 50 µM) die IPM-Synthase hemmt, ist die physiologische Bedeutung als Regulationsmechanismus nicht ausgeschlossen: Bei Energiemangel in der Zelle verschiebt sich das Verhältnis Acetyl-CoA/CoA-SH zugunsten des freien Coenzyms; als Folge wäre eine Blockierung der Leucin-Synthese durch Inaktivierung der IPM-Synthase, insbesondere bei gleichzeitigem Mangel an KIV, möglich.

### 3.5.8 Die unspezifische Reaktion der IPM-Synthase mit α-Ketosäuren und Homologen des Acetyl-CoA

Die meisten Enzyme des Zellstoffwechsels weisen eine hohe Spezifität für die von ihnen umgesetzten Substrate auf. Dagegen ist für die IPM-Synthase mehrfach berichtet worden, daß sich die Kondensation einer Reihe von α-Ketosäuren mit Acetyl-CoA zu Alkyläpfelsäuren katalysiert (WEBSTER et al., 1965; RABIN et al., 1968; HILL, 1968; KOHLHAW et al., 1969; SAI et al., 1969; BAUMGARTEN, 1969; ULM et al., 1972). Für das Enzym aus Hydrogenomonas H 16 konnte WIEGEL (1974) weiterhin nachweisen, daß auch Homologe des Acetyl-CoA umgesetzt werden. Bei allen untersuchten Organismen wiesen jedoch α-Ketoisovalerat und Acetyl-CoA die jeweils höchste Affinität zur IPM-Synthase auf; sie werden daher als die „natürlichen" Substrate des Enzyms angesehen. Zwar wurden mit α-Ketoisobutyrat stets höhere Umsatzraten als mit KIV erzielt, doch schränken die relativ hohen $K_m$-Werte die physiologische Bedeutung dieses Substrates ein (vgl. „Diskussion"). Durch Kombination verschiedener Acyl-CoA-Verbindungen mit α-Ketosäuren als Substrate ließ sich eine Vielzahl von Produkten der enzymatisch katalysierten Reaktion postulieren (WIEGEL, 1974).

Auch die IPM-Synthase aus M. denitrificans zeigte die Unspezifität; außer KIV setzte das gereinigte Enzym Pyruvat, α-Ketobutyrat und n-Ketovalerat um. Zwar wurden Pyruvat und α-Ketobutyrat mehr als doppelt so schnell wie α-Ketoisovalerat umgesetzt, doch wies KIV die höchste Affinität zum Enzym auf (Tab. 10).
Auch für das zweite Substrat war die IPM-Synthase unspezifisch: Sowohl mit Acetyl-CoA als auch mit Propionyl-CoA wurde eine Kondensation mit α-Ketosäuren erzielt. Acetyl-CoA zeigte jedoch sowohl die höhere Affinität zum Enzym als auch die größeren Umsatzraten.

Tab. 10 Die Umsetzung von α-Ketosäuren und Propionyl-CoA durch die IPM-Synthase

| Substrat [+] | | rel. $v_{max}$ [++] | Hemmung durch 1 mM L-Leucin [+++] Restaktivität in % |
|---|---|---|---|
| KIV | $2,8 \times 10^{-5}$ M | 1 | 12 |
| Pyruvat | $4,0 \times 10^{-3}$ M | 2,2 | 19 |
| Ketovalerat | $4,0 \times 10^{-4}$ M | 0,5 | 14 |
| Butyrat | $2,0 \times 10^{-4}$ M | 2,8 | 14 |
| Ac-CoA | $1,0 \times 10^{-4}$ M | 1 | - |
| Propionyl-CoA | $8,7 \times 10^{-4}$ M | 0,7 | - |

+) Die Substratsättigungskurven wurden im optischen Test mit DTNB (s. „Methoden") aufgenommen. Zur Bestimmung der $K_m$- und $v_{max}$-Werte für die α-Ketosäuren wurde Acetyl-CoA als 2. Substrat eingesetzt, bei den Acyl-CoA-Verbindungen diente KIV als weiteres Substrat.

++) rel. $v_{max} = v_{max} / v_{max}$ für Acetyl-CoA bzw. KIV

+++) Die Bestimmung der Aktivität erfolgte im fluorimetrischen Test (s. „Methoden") bei pH 7,5; die α-Ketosäuren wurden in einer Konzentration von 20 mM eingesetzt.

Eine Bestätigung, daß die Umsetzung der α-Ketosäuren von der IPM-Synthase katalysiert wurde, gibt die Hemmbarkeit der Reaktio-

nen durch Leucin: Die Bildung der Alkyläpfelsäuren aus Pyruvat, α-Ketobutyrat und n-Ketovalerat wurde im gleichen Ausmaß wie die Kondensation von KIV mit Acetyl-CoA gehemmt. Eine eingehendere Charakterisierung der Kondensationsprodukte, insbesondere bei der Umsetzung mit Propionyl-CoA, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

### 3.5.9 Der Einfluß von Aminosäuren und strukturanalogen Verbindungen auf die Aktivität der IPM-Synthase

#### 3.5.9.1 Die Hemmbarkeit der IPM-Synthase durch verschiedene Aminosäuren

In allen bisher untersuchten Organismen unterliegt die IPM-Synthase einer Endprodukthemmung durch Leucin. In einzelnen Fällen wurde berichtet, daß strukturanaloge Verbindungen das Enzym ebenfalls hemmen. So wird die Aktivität der IPM-Synthase aus Salmonella typhimurium durch Cyclohexanalanin, Isoleucin und Trifluorleucin (CALVO und UMBARGER, 1963; UMBARGER et al., 1965) herabgesetzt. Das Enzym aus Neurospora crassa ist durch Trifluorleucin, Isoleucin, Valin und Azaleucin hemmbar (WEBSTER und GROSS, 1965). Die IPM-Synthase aus Pseudomonas aeruginosa wird ebenfalls durch Isoleucin gehemmt (RABIN et al., 1968).

Der Einfluß verschiedener Aminosäuren und strukturanaloger Verbindungen auf die Aktivität der IPM-Synthase aus M. denitrificans wurde im fluorimetrischen Test bei pH 7,5 ermittelt, da die Effektoren im optischen Test mit DTNB bei pH 8,0 nur gering wirksam waren (vgl. Kap. 3.5.9.5). Unter den in Tab. 11 angegebenen Bedingungen verminderte L-Leucin die Aktivität des Enzyms um 91 %. Die strukturanalogen Verbindungen Azaleucin und Trifluorleucin setzten die Aktivität um 18 bzw. 22 % herab. Geringe Hemmwirkung zeigten auch DL-Leucin, DL-Norvalin, Cycloleucin, D-Leucin und L-Cystein. Keinen Einfluß auf die Enzymaktivität hatten Valin und Isoleucin. Außer den in Tab. 11 aufgeführten Aminosäuren wurden weiterhin L-Alanin, L-Arginin, L-Asparagin, L-Gluta-

min, L-Glutaminsäure, L-Glycin, L-Histidin, L-Lysin, L-Methionin, L-Phenylalanin, L-Prolin, L-Serin, L-Threonin und L-Tryptophan geprüft. Sie erwiesen sich ebenfalls als wirkungslos.

Tab. 11 Die Hemmbarkeit der IPM-Synthase durch Leucin und strukturanaloge Verbindungen

| zugesetzte Aminosäure | Konzentration (mM) | Fluoreszenz-einheiten + | Prozent Aktivität ++ |
|---|---|---|---|
| - | - | 845 | 100 |
| DL-Norleucin | 10 | 682 | 81 |
| DL-Norvalin | 10 | 710 | 84 |
| DL-Trifluorleucin | 10 | 186 | 22 |
| 4-Azaleucin | 10 | 152 | 18 |
| L-Valin | 5 | 814 | 96 |
| L-Isoleucin | 5 | 824 | 98 |
| L-Leucin | 5 | 80 | 9 |
| D-Leucin | 5 | 695 | 82 |
| Cycloleucin | 5 | 714 | 84 |
| L-Cystein | 5 | 780 | 92 |

+) Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im fluorimetrischen Test bei pH 7,5. Die weiteren Bedingungen sind unter „Methoden" angegeben; gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe eines ca. 18fach angereicherten Enzyms.

++) Aktivität der IPM-Synthase ohne Zusatz = 100 %.

### 3.5.9.2 Die Aufhebung der durch Leucin bewirkten Hemmung der IPM-Synthase durch verschiedene Aminosäuren

Während die IPM-Synthase bei allen daraufhin untersuchten Organismen einer Endprodukthemmung durch Leucin unterliegt, ist eine Reaktivierung des Enzyms durch Valin nur für Hydrogenomonas H 16 und Micrococcus denitrificans beschrieben worden (HILL, 1968). Bei Hydrogenomonas H 16 wurde eine Aufhebung der Hemmung auch durch Cycloleucin, Isoleucin, Norleucin und Norvalin bewirkt.

Es wurde geprüft, ob sich die Hemmung der IPM-Synthase aus M. denitrificans ebenfalls durch dem Leucin strukturverwandte Verbindungen oder andere Aminosäuren aufheben läßt. Tab. 12 zeigt, daß L-Valin und L-Isoleucin bei dem durch L-Leucin gehemmten Enzym die größte Aktivitätssteigerung bewirkten. Doch auch Norleucin, Norvalin und α-Aminobuttersäure hoben die Hemmung teilweise auf. Eine erhebliche Aktivitätssteigerung wurde ebenfalls durch L-Cystein und L-Phenylalanin erreicht, während L-Tryptophan keinen Effekt zeigte. Die strukturelle Ähnlichkeit der hemmenden und reaktivierenden Aminosäuren läßt auf einen kompetitiven Mechanismus schließen. Deshalb wurde die Abhängigkeit der Aktivitätssteigerung der durch L-Leucin gehemmten IPM-Synthase von der zugesetzten Menge an L-Valin geprüft.

Tab. 12 Die Wirkung von Aminosäuren und strukturanalogen Verbindungen auf die durch 0,2 mM L-Leucin gehemmte IPM-Synthase

| zugesetzte Aminosäure | Konzentration (mM) | Fluoreszenz-einheiten + | Prozent Aktivität ++ |
|---|---|---|---|
| - | - | 261 | 31 |
| DL-Norleucin | 10 | 601 | 71,2 |
| DL-Norvalin | 10 | 493 | 58,4 |
| DL-α-Aminobuttersäure | 10 | 644 | 76,2 |
| L-Valin | 5 | 796 | 94,2 |
| L-Isoleucin | 5 | 700 | 82,8 |
| L-Phenylalanin | 5 | 375 | 44,4 |
| L-Tryptophan | 5 | 272 | 32,2 |
| L-Cystein | 5 | 374 | 44,3 |
| L-Methionin | 5 | 480 | 56,8 |

+) Die Bestimmung der Aktivität erfolgte im fluorimetrischen Test bei pH 7,5. Die Testansätze enthielten 0,2 mM Leucin; gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe eines ca. 18fach angereicherten Enzyms.

++) Aktivität der IPM-Synthase ohne Zusatz; 845 Fluoreszenzeinheiten = 100 %.

Abb. 35 zeigt, daß durch steigende Konzentrationen an L-Valin die Hemmung der Aktivität zunehmend aufgehoben wurde. Eine nahezu vollständige Reaktivierung wurde unter den beschriebenen Bedingungen bewirkt, wenn Valin gegenüber dem Leucin in 50fachem Überschuß vorlag. Eine Aktivitätssteigerung gegenüber einem Kontrollansatz ohne Effektoren wurde bei pH 7,5 auch durch hundertfachen Valin-Überschuß nicht erreicht.

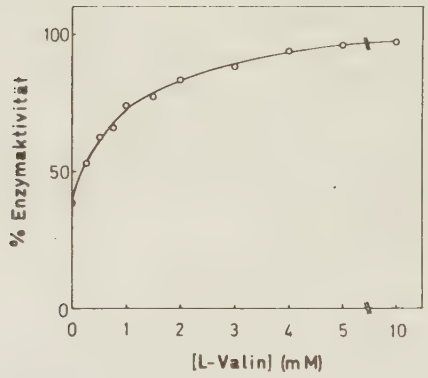


Abb. 35 Die Aktivitätssteigerung der durch L-Leucin gehemmten IPM-Synthase durch steigende Konzentrationen von L-Valin

Die Aktivitätsbestimmung wurde im fluorimetrischen Test bei pH 7,5 durchgeführt. Das Testgemisch ist unter „Methoden" angegeben; zusätzlich enthielt jeder Ansatz 0,2 mM L-Leucin sowie die angegebenen Konzentrationen L-Valin. Die Reaktivierung der durch L-Leucin gehemmten IPM-Synthase durch steigende Valinkonzentrationen ist in Prozenten der Aktivität eines Testansatzes ohne Aminosäurezusätze wiedergegeben.

### 3.5.9.3 Die Abhängigkeit der Hemmung der IPM-Synthase von der Inhibitorkonzentration

Als stärkste Inhibitoren der IPM-Synthase hatten sich L-Leucin sowie die strukturanalogen Verbindungen Azaleucin und Trifluorleucin erwiesen. Um die Abhängigkeit der Aktivitätshemmung von der Inhibitorkonzentration zu ermitteln, wurden den Testansätzen steigende Mengen L-Leucin, Azaleucin und Trifluorleucin zugesetzt. Ebenso wurde die Wirkung zunehmender Inhibitorkonzentration in Gegenwart von L-Valin bestimmt.

Die Aktivität der IPM-Synthase wurde durch steigende Konzentrationen an L-Leucin zunehmend gehemmt. Bereits 0,2 mM L-Leucin führten zu einem Aktivitätsverlust von 70 %. Die maximale Hemmung von 90 % wurde durch 1 mM L-Leucin erreicht. In Gegenwart von L-Valin verringerte sich die Empfindlichkeit des Enzyms gegenüber dem Inhibitor. Das Ausmaß der Hemmung wurde vom jeweiligen Verhältnis Leucin : Valin bestimmt (Abb. 36).

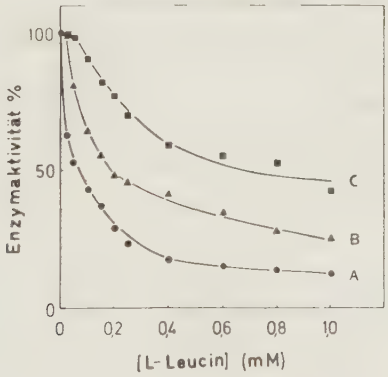


Abb. 36 Die Hemmung der IPM-Synthase in Abhängigkeit von der L-Leucin-Konzentration

Die Aktivitätsbestimmung des ca. 18fach angereicherten Enzyms erfolgte im fluorimetrischen Test (s. „Methoden") bei pH 7,5. Die Ansätze enthielten die angegebenen Konzentrationen L-Leucin sowie Zusätze von

A: kein weiterer Zusatz B: 0,5 mM L-Valin C: 2,0 mM L-Valin

Die dem Leucin strukturanalogen Verbindungen Azaleucin und Trifluorleucin erwiesen sich erst in sehr viel höheren Konzentrationen als wirksam; Konzentrationen von 1 mM hemmten die Aktivität des Enzyms nur um 42 % bzw. 62 %. L-Valin setzte die Affinität der Inhibitoren zum Enzym noch weiter herab (Abb. 37).

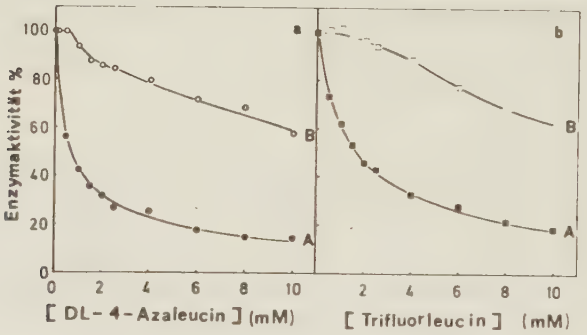


Abb. 37 Die Hemmung der IPM-Synthase in Abhängigkeit von der Konzentration an Azaleucin (a) und Trifluorleucin (b)

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte wie unter Abb. 36 angegeben. Außer den Inhibitoren enthielten die Ansätze
A: kein weiterer Zusatz · B: 2,0 mM L-Valin

### 3.5.9.4 Die Abhängigkeit der Aktivitätshemmung durch L-Leucin von der Substratkonzentration

Der Einfluß des Inhibitors L-Leucin auf die Aktivität der IPM-Synthase wurde im fluorimetrischen Test bestimmt, da die Effektoren im optischen Test mit DTNB bei pH 8,0 nur gering wirksam waren (vgl. Kap. 3.5.9.5). Da die Aktivitätsmessung jedoch durch Endpunktbestimmung des gebildeten Produktes IPM erfolgte, war ein zur Inkubationszeit proportionaler Reaktionsverlauf nur gewährleistet, wenn das Substrat KIV stets in sättigenden Konzentrationen vorlag. Unter diesen Bedingungen zeigten die zugesetzten Kon-

zentrationen an KIV (0,2 - 20 mM) keinen Einfluß auf das Ausmaß der Aktivitätshemmung durch L-Leucin.

Da im verwendeten Test in einer vorgeschalteten Reaktion Acetyl-Phosphat und CoA-SH durch die Phosphotransacetylase zu Acetyl-CoA umgesetzt wurden, ließ sich das Substratangebot für die IPM-Synthase durch das zugesetzte CoA-SH variieren; freigesetztes CoA-SH wurde stets wieder zu Acetyl-CoA regeneriert. Maximale IPM-Bildung war bei einer Konzentration von 1,5 mM CoA-SH erreicht worden. Es wurden Testreihen mit 0,5 mM; 1,5 mM und 3,0 mM CoA-SH in den Ansätzen durchgeführt und jeweils steigende Mengen an L-Leucin zugesetzt. Abb. 38 zeigt, daß die IPM-Synthase bei geringer Konzentration an CoA-SH gegenüber dem Inhibitor empfindlicher war als bei hohen Konzentrationen. Daß das Ausmaß der

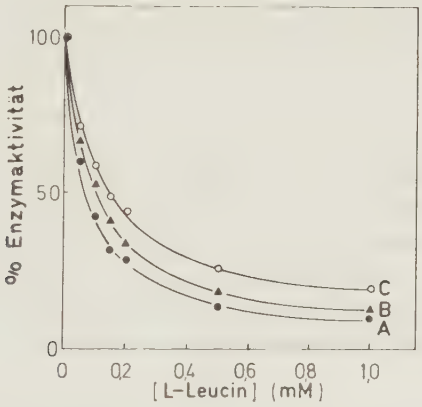


Abb. 38 Die Abhängigkeit der durch L-Leucin bewirkten Aktivitätshemmung von der Acetyl-CoA-Konzentration

Die Aktivitätsbestimmung wurde im fluorimetrischen Test (s. „Methoden") bei pH 7,5 durchgeführt. Jeweils eine Testreihe enthielt

A: 0,5 mM CoA-SH B: 1,5 mM CoA-SH C: 3,0 mM CoA-SH

Zusätzlich wurde in die Ansätze der einzelnen Testreihen die angegebenen Mengen an L-Leucin gegeben; gestartet wurde die Reaktion mit einem ca. 18fach angereicherten Enzym. In der Abb. wurde die durch den Inhibitor verminderte Enzymaktivität in Prozenten des jeweiligen Ansatzes ohne L-Leucin dargestellt.

maximalen Hemmung ebenfalls von der Substratkonzentration abhängig war, läßt nach DIXON und WEBB (1964) auf einen teilweise kompetitiven Mechanismus schließen.
Eine graphische Bestimmung des $K_i$-Wertes für L-Leucin war nicht möglich, da sich in der Auftragung 1/v gegen die Inhibitorkonzentration keine Geraden ergaben.

### 3.5.9.5 Der Einfluß der Effektoren auf die Aktivität der IPM-Synthase in Abhängigkeit vom pH

Von allosterisch empfindlichen Enzymen ist bekannt, daß die Aktivität des katalytischen Zentrums und die Empfindlichkeit des allosterischen Zentrums in verschiedener Weise durch den pH-Wert beeinflußt werden können. Der Einfluß der Effektoren L-Leucin und L-Valin auf die Aktivität der IPM-Synthase in Abhängigkeit vom pH wurde mit einem Enzympräparat, in dem das Enzym aus Wildtypzellen nach FISCHER (1973) 67fach angereichert war, untersucht.

Das Optimum der IPM-Bildung lag in Diäthylamin-HCl-Puffer bei pH 9,5 (vgl. Abb. 29). Da die Effektoren insbesondere bei niederen pH-Werten wirksam waren, wurde ihr Einfluß auf die Enzymaktivität in $KPO_4$-Puffer im Bereich von pH 6,2 bis pH 8,3 untersucht (Abb. 39). Die Aktivität der IPM-Synthase in Ansätzen ohne Aminosäuren stieg in diesem Bereich mit zunehmendem pH um das 4fache an. Das pH-Optimum konnte in $KPO_4$-Puffer nicht bestimmt werden, da die Pufferkapazität oberhalb pH 8,0 zu gering war.

Während die Hemmung der Enzymaktivität durch 0,02 mM L-Leucin bei pH 8,0 nur 15 % der Aktivität eines Ansatzes ohne Inhibitor betrug, erfolgte bei pH 6,2 eine Hemmung von 85 %.
Der Einfluß von L-Valin auf die Enzymaktivität nahm ebenfalls mit abnehmendem pH-Wert zu. Bei pH 8,0 zeigten 0,5 mM L-Valin keine Wirkung auf die Aktivität der IPM-Synthase, bei pH 6,2 erfolgte eine Steigerung der Enzymaktivität um 20 % gegenüber einem Ansatz ohne L-Valin.

Während im fluorimetrischen Test der pH des Reaktionsgemisches verändert werden konnte, erforderte die Aktivitätsbestimmung im optischen Test mit DTNB einen pH von 8,0 bis 8,2, da nur in diesem Bereich die Farbausbildung optimal war (ELLMANN, 1959). Die Effektoren der IPM-Synthase waren dagegen auch in hohen Konzentrationen nur gering wirksam; ihr Einfluß auf die Aktivität des Enzyms wurde deshalb stets im fluorimetrischen Test bestimmt.

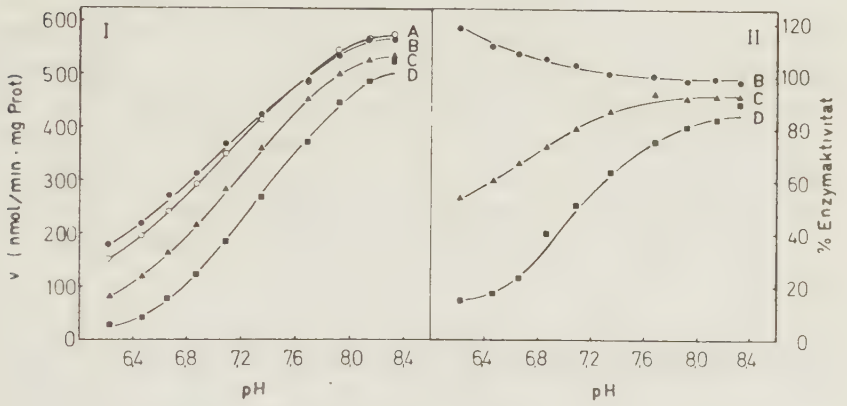


Abb. 39 Der Einfluß von L-Valin und L-Leucin auf die Aktivität der IPM-Synthase in Abhängigkeit vom pH

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im fluorimetrischen Test (s. „Methoden"), der pH wurde wie angegeben variiert. In die Ansätze wurde zusätzlich gegeben:

I A: kein Zusatz

I B: 0,5 mM L-Valin

I C: 0,02 mM L-Leucin + 0,5 mM L-Valin

I D: 0,02 mM L-Leucin

In Abb. II wurde die Aktivität des Enzyms in Ansätzen mit Effektoren als prozentualer Anteil der Aktivität in Ansätzen ohne Aminosäurezusatz beim jeweiligen pH aufgetragen.

### 3.5.9.6 Die Abhängigkeit der Substratsättigung der IPM-Synthase von der Inhibitorkonzentration

Im verwendeten Aktivitätstest, der fluorimetrischen Endpunktbestimmung, konnte der Einfluß der Effektoren auf die Substratsättigung für KIV nicht ermittelt werden, da aufgrund der geringen Produktbildung eine Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion nicht möglich war.

Dagegen ließ sich die Aktivität des Enzyms auch bei niederen Acetyl-CoA-Konzentrationen ermitteln: Durch das regenerierende System mit hohem Überschuß an Acetylphosphat und Phosphotransacetylase blieb die Acetyl-CoA-Konzentration während der Inkubation des Testansatzes stets gleich. Obwohl nicht gewährleistet werden konnte, daß die eingesetzte Menge an CoA-SH der im Testgemisch vorliegenden Konzentration an Acetyl-CoA entsprach, ließ sich der Einfluß des Inhibitors L-Leucin auf die relative Substratsättigung bestimmen.

Das Substratangebot an Acetyl-CoA wurde durch Zugaben von 0,05 mM bis 1,5 mM CoA-SH variiert und den Testreihen 0,05 mM L-Leucin sowie 0,05 mM L-Leucin + 0,25 mM L-Valin zugesetzt. Die Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit gegen die eingesetzte Konzentration an CoA-SH ergab jeweils hyperbolische Kurven; die Reaktion folgte der Michaelis-Menten Kinetik (Abb. 40). Die Lineweaver-Burk-Auftragung zeigt, daß sowohl die Affinität des Substrates zum Enzym als auch die maximale Reaktionsgeschwindigkeit durch das zugesetzte L-Leucin herabgesetzt wurde. Zwar lassen sich die Ergebnisse aufgrund der nicht bestimmbaren Substratkonzentration nur mit Vorbehalt interpretieren, doch kann nach DIXON und WEBB (1964) eine gemischte Hemmung durch den Inhibitor angenommen werden.

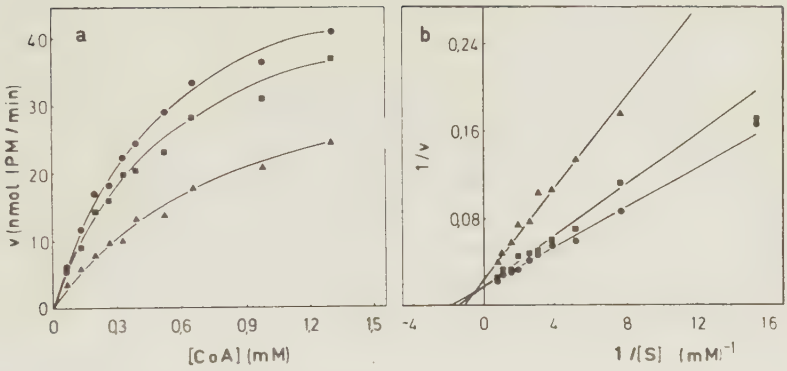


Abb. 40 Die Substratsättigung der IPM-Synthase für Acetyl-CoA in Gegenwart der Effektoren L-Leucin und L-Valin

a) Substratsättigungskurven

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im fluorimetrischen Test bei pH 7,5. Die Ansätze hatten die unter „Methoden" beschriebene Zusammensetzung; gestartet wurde die Reaktion mit einem ca. 18-fach angereicherten Enzympräparat. Das Substratangebot für die IPM-Synthase wurde durch die angegebenen CoA-SH-Konzentrationen variiert. In die Ansätze wurde weiterhin gegeben

●—● kein Zusatz

■—■ 0,2 mM L-Leucin + 0,5 mM L-Valin

▲—▲ 0,2 mM L-Leucin

Die in der Abbildung angegebenen Werte wurden aus zwei parallelen Versuchsansätzen gemittelt.

b) Lineweaver-Burk-Auftragung zu a

### 3.5.10 Der Einfluß von Metallionen auf die Aktivität der IPM-Synthase

Da bereits bei der Gelfiltration der IPM-Synthase mit Sephadex G 200 hohe Aktivitätsverluste auftraten (vgl. Tab. 8), lag die Vermutung nahe, daß bei der Fraktionierung des Extraktes eine Komponente des Enzyms abgetrennt wurde. Doch sowohl durch Inkubation des Enzyms mit einzelnen Fraktionen des Eluats der Gelfiltration als auch durch Vereinigung des gesamten Eluats ließ sich die IPM-Synthase nicht reaktivieren. Da ein Zusatz von 1 mM EDTA zum Reaktionsgemisch die Aktivität des Enzyms bis zu 50 % hemmte, wurde insbesondere die Wirkung zweiwertiger Metallionen auf die Enzymaktivität untersucht.

Wurde die Aktivitätsbestimmung der IPM-Synthase in $KPO_4$-Puffer (pH 7,5) durchgeführt, ließ sich durch Zusatz von 1 mM $CaCl_2$, $FeCl_2$, $NiCl_2$, $CdCl_2$, $MgCl_2$, $MnCl_2$ und $ZnCl_2$ kein signifikanter Einfluß der Metallionen auf die Umsatzraten nachweisen. Dagegen stieg die Aktivität des Enzyms in Tris-Puffer (pH 8,0) gegenüber einem Kontrollansatz um 20 % an, wenn im Reaktionsgemisch 1 mM $MnCl_2$ zugesetzt wurde. In Gegenwart von 1 mM $MnCl_2$ + 1 mM L-Leucin ließ sich eine Steigerung von 36 % erreichen, obwohl der Inhibitor allein die Reaktion um 10 % hemmte. Wurde die Aktivitätsbestimmung bei pH 8,5 durchgeführt, war der Anstieg der Aktivität nach Zusatz von $Mn^{++}$ und L-Leucin noch höher: Gegenüber einem Kontrollansatz nahmen die Umsatzraten um 60 % bzw. 84 % zu (Tab. 13).

Tab. 13 Der Einfluß von Metallionen ($Mg^{++}$, $Mn^{++}$, $Zn^{++}$) und Effektoren auf die Aktivität der IPM-Synthase bei pH 8,0 und pH 8,5

| zugesetzte Metallionen (1 mM) | zugesetzter Effektor | pH des Reaktionsgemisches + | % Aktivität ++ |
|---|---|---|---|
| Kontrolle | - | 8,0 | 100 |
| $Mg^{++}$ | - | " | 100 |
| $Mn^{++}$ | - | " | 120 |
| $Zn^{++}$ | - | " | 88 |
| $Mn^{++}$ | 5 mM L-Valin | " | 115 |
| $Mn^{++}$ | 1 mM L-Leucin | " | 136 |
| Kontrolle | - | 8,5 | 100 |
| $Mn^{++}$ | - | " | 160 |
| $Mn^{++}$ | 5 mM L-Valin | " | 160 |
| $Mn^{++}$ | 1 mM L-Leucin | " | 184 |

+) Die Aktivität der IPM-Synthase wurde im optischen Test mit DTNB (s. „Methoden") bei pH 8,0 und pH 8,5 bestimmt. Zwar ist die Farbausbildung mit DTNB nur bei pH 8,0 - 8,2 optimal, doch war auch bei pH 8,5 eine relative Aktivitätsbestimmung möglich (veränderter molarer Extinktionskoeffizient).

++) Angaben in Prozenten der Aktivität des jeweiligen Ansatzes ohne Metallionen und Effektoren.

Da die Geschwindigkeit der Umsetzung während des Reaktionsablaufes, der im optischen Test bei 412 nm verfolgt wurde, im gemessenen Zeitraum (ca. 15 min) ständig zunahm, ließ sich auf eine Reaktivierung der IPM-Synthase durch $Mn^{++}$ schließen. Bei der Inkubation von Enzympräparaten mit $Mn^{++}$ bei pH 7,5 im Tris-Puffer nahm die Aktivität der IPM-Synthase zwar nicht zu, doch erwies sich das Enzym im gemessenen Zeitraum als stabil (Tab. 14). Eine Reaktivierung des Enzyms scheint nur zu erfolgen, wenn der pH-Wert des Inkubationsgemisches über pH 8,0 liegt.

$Mg^{++}$ hatte weder auf die Aktivität noch auf die Stabilität der IPM-Synthase einen Einfluß; $Zn^{++}$ dagegen förderte die Inaktivierung.

Aus zeitlichen Gründen konnte der Einfluß des Mangans auf die IPM-Synthase nicht näher charakterisiert werden; doch lassen die angegebenen Daten den Schluß zu, daß das aktive Enzym als Metall-Protein-Komplex vorliegt, für dessen katalytische Aktivität $Mn^{++}$ erforderlich ist.

Tab. 14 Die Wirkung von Metallionen ($Mg^{++}$, $Mn^{++}$, $Zn^{++}$) auf die Stabilität der IPM-Synthase

| Zusatz zum Extrakt [+] (1 mM) | % Aktivität [++] Inkubationszeit (Tage) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 1 | 2 | 4 | 6 | 10 |
| Kontrolle | 100 | 95 | 91 | 85 | 74 | 66 |
| $Mg^{++}$ | 100 | 96 | 91 | 85 | 73 | 68 |
| $Mn^{++}$ | 100 | 100 | 100 | 100 | 98 | 98 |
| $Zn^{++}$ | 94 | 83 | 72 | 62 | 54 | 46 |

+) Der Extrakt war mit Tris-HCl (pH 7,5) gepuffert.

++) Die Aktivität wurde im optischen Test mit DTNB (s. „Methoden") bestimmt und ist in Prozenten der Aktivität der Kontrolle zum Zeitpunkt t = 0 angegeben.

## 4. DISKUSSION

Die ersten Hinweise bei der Bearbeitung der Frage nach der Herkunft des Kohlenstoffgerüstes des Leucin erhielten ABELSON und VOGEL (1955). Sie zogen E. coli auf uniform $^{14}$C-markierter Glucose an, ersetzten dann das Substrat durch Valin, α-Ketoisovalerat oder Pyruvat und stellten nach kurzer Inkubation der Zellen bei der Analyse eine Abnahme der Radioaktivität des Leucins fest. Die Autoren nahmen aufgrund dieser Versuche eine Kondensation von α-Ketoisovalerat und einem $C_2$-Körper an, deren Produkt durch anschließende Decarboxylierung zum Kohlenstoffgerüst des Leucins führt. STRASSMANN et al. (1955, 1956) zeigten, daß $^{14}$C-markiertes Acetat und Lactat als Substrat für Torulopsis utilis hohe Radioaktivität des Leucins zur Folge hat. Aus dem Kulturmedium leucinauxotropher Mutanten von Salmonella typhimurium und Neurospora crassa wurden α-Isopropylmalat und β-Isopropylmalat als Akkumulationsprodukte identifiziert und isoliert (JUNGWIRTH et al., 1961, 1963; GROSS et al., 1962; CALVO et al., 1962; BURNS et al., 1963). MARTIN et al. (1962) wiesen α-Isopropylmalat in der Nährbrühe leucinbedürftiger Mutanten von Aspergillus fumigatus, Streptomyces erythraeus, Nocardia lurida und Corynebacterium spec. nach. Aufgrund dieser Befunde konnte auf drei an der Synthese des Kohlenstoffgerüstes des Leucins beteiligte Enzyme geschlossen werden.

Der von STRASSMANN et al. (1955, 1956) formulierte Biosyntheseweg geht von der Ketovorstufe des Valins aus. Das erste spezifische Enzym des Leucinweges katalysiert die irreversible Kondensation der α-Ketoisovaleriansäure mit Acetyl-CoA. Auf Vorschlag von STRASSMANN und CECI (1963) wird das Enzym nach seinem Produkt als α-Isopropylmalat-Synthase bezeichnet. Im nächsten Schritt wird die gebildete α-Isopropyläpfelsäure durch Wasserabspaltung und Wasseranlagerung isomerisiert (GROSS et al., 1963). Die anschliessende Decarboxylierung der β-Isopropyläpfelsäure zu α-Ketoisocapronsäure erfolgt unter gleichzeitiger Reduktion von $NAD^+$. Die von der β-Isopropylmalat-Dehydrogenase katalysierte Reaktion ist durch die Kohlendioxydabspaltung ebenfalls irreversibel (BURNS et al., 1963; PARSON und BURNS, 1969).

Die Transaminierung der α-Ketoisocapronsäure zum L-Leucin wird durch die Transaminase B (RUDMAN und MEISTER, 1953) katalysiert. Das Enzym ist jedoch nicht spezifisch für L-Leucin, sondern es transaminiert ebenfalls L-Valin und L-Isoleucin mit α-Ketoglutarsäure. Mutanten von Salmonella typhimurium, die eine defekte Transaminase besaßen, waren valin-, isoleucin- und leucinbedürftig (RAMAKRISHNAN und ADELBERG, 1965).

Das Schlüsselenzym dieses Biosyntheseweges, die α-Isopropylmalat-Synthase, wurde bei einer Vielzahl von Mikroorganismen nachgewiesen (CALVO et al., 1962; MARAGOUDAKIS und STRASSMANN, 1967; RABIN et al., 1968; HILL, 1968; BAUMGARTEN, 1969; STIEGLITZ und CALVO, 1974). Eingehende Untersuchungen liegen für die Enzyme aus Neurospora crassa (WEBSTER et al., 1965), Salmonella typhimurium (KOHLHAW et al., 1969), Saccharomyces carlsbergensis (SAI et al., 1969), Saccharomyces spec. (ULM et al., 1972) und Hydrogenomonas eutropha H 16 (HILL und SCHLEGEL, 1969a; WIEGEL, 1974) vor. Die IPM-Synthase wurde weiterhin in der Blaualge Anabaena variabilis (HOOD und COAR, 1972) sowie in Keimlingen von Zea mays (OAKS, 1965) nachgewiesen. Die Biosynthese des Leucins verläuft bei allen aufgeführten Organismen über den „α-Isopropylmalat-Weg".

Dagegen gibt es Hinweise, daß bei einigen Pansenbakterien ein davon abweichender Weg der Leucinbiosynthese beschritten wird. Bei der Inkubation von Peptostreptococcus elsdenii, Bacteroides ruminicula und Ruminococcus flavefaciens mit $^{14}$C-markierter Isovaleriansäure bauten die Organismen die Verbindung in das Zellprotein ein; die Radioaktivität ließ sich nach saurer Hydrolyse des Proteins fast vollständig im Leucin nachweisen (ALLISON et al., 1962; 1966). In-vitro-Versuche machten wahrscheinlich, daß die Bildung des Leucins durch reduktive Carboxylierung der Isovaleriansäure zu α-Ketoisocaproat und anschließender Transaminierung erfolgt (ALLISON und PEEL, 1971). Die Autoren zeigten, daß die reduktive Carboxylierung nur in Gegenwart von Ferredoxin oder eines Elektronenüberträgers mit hohem Redox-Potential erfolgt und postulierten ein Enzymsystem ähnlich den „Pyruvat-Synthethasen" aus Clostridium pasteurianum (BACHOFEN et al., 1964), Chlostri-

dium kluyveri (ANDREW und MORRIS, 1965) und photosynthetischen Bakterien (EVANS und BUCHANAN, 1965).

Ausgehend von der Isovaleriansäure wäre ein zweiter Leucinbiosyntheseweg denkbar. IMAI et al. (1963) wiesen bei Escherichia coli nach Wachstum auf n-Valeriansäure eine β-n-Propylmalat-Synthase nach, die n-Valeryl-CoA mit Glyoxylsäure zu β-n-Propyläpfelsäure kondensiert. Ein ähnliches Enzym könnte die Kondensation von Isovaleryl-CoA mit Glyoxalat zu β-Isopropyläpfelsäure, einem Intermediärprodukt des herkömmlichen Biosyntheseweges, katalysieren. Doch ist das zur Umsetzung von β-Isopropylmalat in die Ketovorstufe des Leucins erforderliche Enzym, die β-Isopropylmalat-Dehydrogenase, in Pansenbakterien nur mit geringen Aktivitäten vorhanden (ALLISON et al., 1966).
Es ist nicht geklärt, welchen Anteil der „Isopropylmalat-Weg" und der „Isovalerat-Weg" an der Leucin-Synthese in den aufgeführten Pansenbakterien haben; zwar ließ sich in Zellextrakten keine aktive IPM-Synthase nachweisen, doch wurde durch Isotopenmarkierungsexperimente gezeigt, daß in den Zellen α-Ketoisovalerat zu Leucin umgesetzt werden kann (ALLISON, 1971).

Untersuchungen von HILL (1968) und FISCHER (1973) ergaben, daß Micrococcus denitrificans das charakteristische Enzym des herkömmlichen Leucinbiosyntheseweges, die IPM-Synthase, besitzt; die enzymatisch katalysierte Kondensation von α-Ketoisovalerat mit Acetyl-CoA ließ sich durch fluorimetrischen Nachweis des gebildeten Isopropylmalats zeigen.
Das von CALVO et al. (1969) beschriebene Verfahren wurde in den vorliegenden Untersuchungen auch zur Aktivitätsbestimmung des Enzyms angewandt. Aufgrund der Spezifität des Nachweises des Produktes war die Methode insbesondere für Aktivitätsbestimmungen in Rohextrakten und wenig angereicherten Enzympräparaten geeignet. Für enzymkinetische Messungen war der Test jedoch nachteilig, da er auf einer Endpunktbestimmung des gebildeten Produktes beruht.

**Eine Aktivitätsbestimmung der IPM-Synthase im optischen Test mit DTNB war erst nach Abtrennung störender Thioesterasen möglich.**

Unter normalen Anzuchtbedingungen wird in Mikroorganismen die genetisch festgelegte Kapazität zur Bildung von Enzymen, deren Biosynthese durch Repression und Derepression gesteuert wird, bei weitem nicht voll ausgenutzt; insbesondere Enzyme des anabolischen Stoffwechsels liegen oft nur in geringen Konzentrationen vor. Doch läßt sich die Bildung vieler Enzyme durch geeignete Anzuchtbedingungen oder durch genetische Manipulationen erhöhen (DEMAIN, 1971).
Auch für die Synthese der Enzyme des Leucinweges verfügen die Mikroorganismen über erhebliche Leistungsreserven. CALVO und CALVO (1967) erreichten in einer Mutante von Salmonella typhimurium mit konstitutiv dereprimierter Leucin-Biosynthese eine zehnfache Anreicherung der Enzyme. HILL (1959) und WIEGEL (1974) zogen für Valin auxotrophe Mutanten von Hydrogenomonas eutropha H 16, deren AHS-Synthasen defekt waren, unter Begrenzung des Wachstums durch L-Valin an; unter diesen Bedingungen zeigten die Mutanten eine gegenüber Wildtypzellen mehr als das zwanzigfache erhöhte spezifische Aktivität der IPM-Synthase. Entsprechende Mutanten von anderen Mikroorganismen konnten durch ähnliche Bedingungen ebenfalls zu einer dereprimierten Bildung der IPM-Synthase veranlaßt werden (BURNS et al., 1966; SATYANARAYANA et al., 1968; BAUMGARTEN, 1972).

Da die IPM-Synthase in Wildtypzellen von Micrococcus denitrificans nur mit geringen Aktivitäten vorlag, war zur Charakterisierung des Enzyms eine Anreicherung unerläßlich. In Vorversuchen erwies sich jedoch, daß eine Reinigung durch Abtrennen anderer Proteine aufgrund der Instabilität des Enzyms sehr aufwendig war (FISCHER, 1973). Deshalb erschien es günstig, eine „biologische Anreicherung" der IPM-Synthase durch Anzucht einer geeigneten auxotrophen Mutante unter Derepressionsbedingungen durchzuführen, um bei der Proteinfraktionierung von Extrakten mit hoher spezifischer Aktivität des Enzyms ausgehen zu können.
Für die Zellanzucht unter Supplementbegrenzung wurde die zweifach

blockierte Mutante HF 144 ($Ile^-$, $Val^-$, $Leu^-$) gewählt, die einen Defekt der AHS-Synthase aufwies und zusätzlich in der Leucinbiosynthese blockiert war; dem Nährmedium wurde sowohl Valin als auch Leucin in wachstumsbegrenzenden Mengen zugesetzt.
Während in Kulturen von einfach blockierten Mutanten sich häufig spontan auftretende prototrophe Revertanten aufgrund des schnelleren Wachstums durchsetzen und die Mutanten überwachsen (WIEGEL, 1974), ließen sich bei Anzuchten der doppelt blockierten Mutante HF 144 keine prototrophen Revertanten nachweisen; zwar traten Zellen auf, die sich nur noch für eine Aminosäure bedürftig zeigten, doch waren auch diese weiterhin im Wachstum durch Leucin begrenzt. Dadurch ließen sich außerordentlich hohe Aktivitäten der IPM-Synthase in den Zellen erreichen. In der Phase extremen Leucinmangels wurden spezifische Aktivitäten der IPM-Synthase von 350 - 550 E/g Protein bestimmt; gegenüber Wildtypzellen enthielten die Mutanten das Enzym 30 - 50fach angereichert.

Bei der weiteren Anreicherung der IPM-Synthase durch Proteinfraktionierung traten stets hohe Aktivitätsverluste auf, die sich z. T. auf eine Kältelabilität des Enzyms zurückführen ließen. Über eine Empfindlichkeit der IPM-Synthase gegen niedere Temperaturen ist bisher nur für das Enzym aus Hydrogenomonas eutropha H 16 berichtet worden (WIEGEL, 1974).

Über den Mechanismus der Kälteinaktivierung von Enzymen liegen unterschiedliche Angaben vor. KUMAR et al. (1972) postulierten bei der Fettsäuresynthetase aus Schweineleber eine Inaktivierung des Enzyms durch Oxidation von SH-Gruppen in der Kälte. Dagegen führt SMITH (1971) die Inaktivierung der Fettsäuresynthetase aus Rattenleber, die parallel zum Zerfall des Enzymkomplexes in Untereinheiten verläuft, allein auf eine Änderung der polaren und apolaren Wechselwirkung von Aminosäureresten des Proteins zurück. Durch Inkubation des Enzyms mit $D_2O$, das nach LEE und BERN (1968) die hydrophoben Wechselwirkungen verstärkt, die hydrophilen Wechselwirkungen aber vermindert, wurde die Kälteinaktivierung weitgehend verhindert; eine Reaktivierung des dissoziierten Enzyms in der Wärme erforderte keine reduzierenden Agenzien (SMITH und

ABRAHAM, 1971).
Auch die IPM-Synthase aus Hydrogenomonas eutropha H 16 war nach Austausch des $H_2O$ gegen $D_2O$ in der Kälte stabil (WIEGEL, 1974). Jedoch ist nicht geklärt, ob die Kältelabilität der Enzyme auf einer Zunahme der polaren Wechselwirkungen oder auf einer Abnahme der apolaren Wechselwirkungen der Aminosäurereste des Proteins bei niederen Temperaturen beruht.
Die IPM-Synthase aus Micrococcus denitrificans verlor in der Kälte, insbesondere in verdünnten Extrakten, ebenfalls rasch an Aktivität; doch ließ sie sich durch Zusatz von α-Ketoisovalerat weitgehend stabilisieren. Kälteinaktiviertes Enzym konnte weiterhin durch Inkubation bei Raumtemperatur ohne weitere Zusätze nahezu vollständig reaktiviert werden. Ob die Inaktivierung die Folge einer Dissoziation des Enzyms in Untereinheiten ist, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten; daß die IPM-Synthase aus Untereinheiten besteht, konnte durch Gradientengel-Elektrophorese wahrscheinlich gemacht werden (s. u.).

Für die gereinigte IPM-Synthase wurde mit Hilfe der Gelfiltration ein Molekulargewicht von 96 000 bestimmt; das steht in relativ guter Übereinstimmung mit dem in der Gradientengel-Elektrophorese ermittelten Molekulargewicht von 94 000. Damit weist das Enzym aus Micrococcus denitrificans das geringste Molekulargewicht der bisher isolierten IPM-Synthasen auf: Für die Enzyme aus Hydrogenomonas eutropha H 16 wurden 115 000 (WIEGEL, 1974), aus Saccharomyces spec. 137 000 (ULM et al., 1972), aus Neurospora crassa 143 000 (WEBSTER und GROSS, 1965) und aus Salmonella typhimurium 200 000 (KOHLHAW und BOATMAN, 1971) bestimmt.

Eingehende Untersuchungen über die Wirkung des Effektors L-Leucin und des Substrates Acetyl-CoA auf die Struktur der IPM-Synthase liegen für das Enzym aus Salmonella typhimurium von KOHLHAW und BOATMAN (1971) vor. Die Autoren wiesen nach, daß die IPM-Synthase aus vier Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 50 000 besteht. In „nativen" Proteinlösungen bildeten sich bevorzugt Aggregate der Untereinheiten von Dimeren und Tetrameren, die in Gegenwart von Leucin zu Monomeren und Dimeren zerfielen. Durch Ace-

tyl-CoA, das kompetitiv zum Inhibitor wirkt, stellten sich wieder bevorzugt Aggregate von Dimeren und Tetrameren ein.
Durch elektrophoretische Auftrennung des gereinigten Enzyms in Porengrößegradientengelen konnte gezeigt werden, daß die IPM-Synthase aus Micrococcus denitrificans zumindest aus zwei Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 47 000 besteht. Weiterhin wurde in den Gelen eine Bande nachgewiesen, deren Proteine ein Molekulargewicht von 23 500 aufweisen; da das Molekulargewicht der aktiven IPM-Synthase ein ganzzahliges Vielfaches davon ist, kann vermutet werden, daß es sich hierbei ebenfalls um Untereinheiten des Enzyms handelt.

In diesem Zusammenhang muß ein Befund diskutiert werden, der sich erst gegen Ende der experimentellen Untersuchungen ergab und noch einer eingehenden Klärung bedarf. An der gereinigten IPM-Synthase konnte nachgewiesen werden, daß sowohl für die katalytische Aktivität des Enzyms als auch für die stabile Konfiguration des Enzymproteins Manganionen erforderlich sind. $Mn^{++}$ erwies sich als äusserst spezifisch für das Enzym, $Mg^{++}$ zeigte keine Wirkung, $Zn^{++}$ inaktivierte das Enzym sogar.
Die äußerst hohen Aktivitätsverluste bei der Enzymanreicherung lassen sich durch eine Abtrennung des Metallions bei den einzelnen Fraktionierungsschritten erklären; ein Zerfall des Enzymproteins in Untereinheiten nach Abtrennung des $Mn^{++}$ erscheint wahrscheinlich.

Einen Hinweis darauf, daß es sich bei der IPM-Synthase um einen Metall-Protein-Komplex handelt, gab die Inaktivierung des Enzyms durch EDTA (FISCHER, 1973), die auch bei den Enzymen aus Salmonella typhimurium (KOHLHAW et al., 1969) und Hydrogenomonas eutropha H 16 (WIEGEL, 1974) gefunden wurde. Aufgrund eingehender Untersuchungen zur Inaktivierung des Enzyms durch EDTA postulierte WIEGEL (1974) für die IPM-Synthase einen Metall-Protein-Komplex und wies darauf hin, daß nach EGGERER und KLETTE (1971) die IPM-Synthase-Reaktion eine Aldolreaktion ist, deren Katalyse die Beteiligung eines Metallions erfordert. Inzwischen konnte die Aktivitätssteigerung durch $Mn^{++}$ auch für die IPM-Synthase aus Hydro-

genomonas eutropha H 16 bestätigt werden (WIEGEL, pers. Mitteilung).

Eine Aufnahme der Sättigungskurven für die Substrate KIV und Acetyl-CoA war bei der IPM-Synthase aus Micrococcus denitrificans nur im optischen Test mit DTNB bei 8,0 möglich. Die beiden Substrate zeigten relativ hohe Unterschiede in ihren Affinitäten zum Enzym. Halbmaximale Substratsättigung der IPM-Synthase wurde für KIV bereits bei einer Konzentration von $2{,}8 \times 10^{-5}$ M erreicht, für Acetyl-CoA wurde ein $K_m$-Wert von $1 \times 10^{-4}$ M bestimmt. Doch wiesen auch bei den Enzymen aus anderen Organismen die beiden Substrate unterschiedlich hohe $K_m$-Werte auf (Tab. 13).

Tab. 13 Aufstellung bisher bestimmter $K_m$-Werte der Substrate α-KIV und Acetyl-CoA für IPM-Synthasen aus verschiedenen Mikroorganismen

| Mikroorganismus | pH | $K_m$ für KIV | $K_m$ für Ac-CoA | Autor |
|---|---|---|---|---|
| Neurospora crassa | 7,5 | $1 \times 10^{-5}$ M | $2{,}45 \times 10^{-5}$ M | WEBSTER und GROSS, 1965 |
| Salmonella typhimurium | 8,5 | $6 \times 10^{-5}$ M | $2 \times 10^{-4}$ M | KOHLHAW et al., 1969 |
| Hydrogenomonas H 16 | 8,2 | $6 \times 10^{-5}$ M | $7{,}5 \times 10^{-5}$ M | WIEGEL, 1974 |
| Micrococcus denitrificans | 8,0 | $2{,}8 \times 10^{-5}$ M | $1 \times 10^{-4}$ M | |
| Saccharomyces spec. | 8,5 | $1{,}6 \times 10^{-5}$ M | $9 \times 10^{-6}$ M | ULM et al., 1971 |
| Saccharomyces carlsbergensis | 7,4 | $2{,}6 \times 10^{-5}$ M | - | SAI et al., 1969 |

Die Substratsättigungskurven folgten der normalen Michaelis-Menten-Kinetik; aus den Hill-Auftragungen ließ sich nicht auf die Zahl der substratbindenden Zentren schließen. Dagegen verfügt die IPM-Synthase aus Salmonella typhimurium über mindestens zwei Bindungsstellen für Acetyl-CoA (KOHLHAW et al., 1969). WIEGEL (1974) fand bei der IPM-Synthase aus Hydrogenomonas eutropha H 16 sowohl für KIV als auch für Acetyl-CoA von der Michaelis-

Menten-Kinetik abweichende Sättigungskurven; beide Substrate bewirkten homotrophe Effekte, die sich mit fortschreitender Sättigung mehrfach änderten („bumpy curves", TEIPEL und KOSHLAND, 1969). Aus der Hill-Auftragung der Substratsättigungskurven ergaben sich mindestens vier Bindungsstellen für Acetyl-CoA und mindestens drei für KIV.

Die α-Isopropylmalat-Synthase, das erste spezifische Enzym des Leucin-Biosyntheseweges, unterliegt bei allen daraufhin untersuchten Mikroorganismen einer Endprodukthemmung durch Leucin. Darüber hinaus ist die Aktivität des Enzyms aus Salmonella typhimurium durch Trifluorleucin, Cyclohexanalanin und Azaleucin hemmbar (CALVO und UMBARGER, 1963; UMBARGER et al., 1965; STIEGLITZ und CALVO, 1971). Die α-Isopropylmalat-Synthase aus Neurospora crassa war unter bestimmten Bedingungen gegen Valin, Isoleucin, Azaleucin und Phenylalanin empfindlich (WEBSTER und GROSS, 1965).

Eingehend untersucht worden ist das Enzym von Salmonella typhimurium. Die Aktivität des Enzyms ist durch Leucin hemmbar (CALVO und UMBARGER, 1963), das kompetitiv zum Substrat Acetyl-CoA wirkt (KOHLHAW et al., 1968). Der Inhibitor bewirkt eine Dissoziation des Enzyms in vier Untereinheiten, die ein Molekulargewicht von jeweils 50 000 haben (LEARY und KOHLHAW, 1970). Restauration des nativen quaternären Enzyms kann durch das Substrat Acetyl-Coenzym A erfolgen, das antagonistisch zum Inhibitor wirkt (KOHLHAW und BOATMAN, 1971). BARTHOLOMEW und CALVO (1971a) zeigten durch Analyse der Aminosäurezusammensetzung nach der „finger-print"-Methode, daß die Untereinheiten des Enzyms aus identischen Polypeptidketten bestehen. Ein gegen Leucin unempfindliches Enzym aus Salmonella typhimurium wies eine veränderte Sequenz der Aminosäuren am COOH-terminalen Ende der Polypeptidketten auf (BARTHOLOMEW und CALVO, 1971b). Die Beteiligung von freien SH-Gruppen des Enzyms bei der Umsetzung der Substrate konnte wahrscheinlich gemacht werden (KOHLHAW et al., 1968; KOHLHAW, 1970; BARTHOLOMEW und CALVO, 1971b).

Die vorliegenden Untersuchungen ergaben, daß die Aktivität der α-Isopropylmalat-Synthase aus Micrococcus denitrificans ebenfalls durch L-Leucin gehemmt wird. Trifluorleucin und Azaleucin erwiesen sich in hohen Konzentrationen als Hemmstoff. Da die weiteren geprüften Strukturanalogen des L-Leucins ebenso wie die natürlichen Aminosäuren keine oder nur geringe hemmende Wirkung zeigten, kann auf große Spezifität der Bindungsstelle(n) geschlossen werden.
Über eine Inaktivierung der IPM-Synthase durch CoA-SH ist bisher nur für die Enzyme aus Saccharomyces spec. (ULM et al., 1971) Micrococcus denitrificans (FISCHER, 1973) und Hydrogenomonas eutropha H 16 (WIEGEL, 1974) berichtet worden; bei allen drei Enzymen bewirkten schon relativ geringe Konzentrationen (ca. 10 µM) an CoA-SH eine weitgehende Hemmung der Aktivität. Das Substrat KIV schützt die Enzyme zwar vor der Inaktivierung durch CoA-SH, bewirkt aber keine Aufhebung der Hemmung. Eine Regulation des Biosyntheseweges durch CoA-SH in der Zelle erscheint durchaus sinnvoll: Bei Energiemangel, insbesondere bei gleichzeitigem Mangel an KIV, wird das erste Enzym des Biosyntheseweges blockiert.

L-Leucin wirkt bei α-Isopropylmalat-Synthase aus Micrococcus denitrificans gegenüber dem Substrat α-Ketoisovalerat nicht-kompetitiv. Entsprechende Ergebnisse sind für die Enzyme aus Salmonella typhimurium (KOHLHAW et al., 1969) und Hydrogenomonas eutropha H 16 (HILL und SCHLEGEL, 1969a; WIEGEL, 1974) erhalten worden.
Die beobachtete Wechselwirkung von Acetyl-CoA und L-Leucin auf die Aktivität der α-Isopropylmalat-Synthase aus Micrococcus denitrificans ist nur unter Vorbehalten zu interpretieren. Der Ansatz des Testes erlaubt es nicht, klar definierte Bedingungen zu schaffen. Doch kann aufgrund der erhaltenen Ergebnisse vermutet werden, daß Acetyl-CoA teilweise kompetitiv zum L-Leucin wirkt. Ein ähnlicher Mechanismus für die Wechselwirkung zwischen Substrat und Inhibitor auf die Aktivität der α-Isopropylmalat-Synthase wurde für die Enzyme aus Neurospora crassa (WEBSTER und GROSS, 1965) und Hydrogenomonas eutropha H 16 (WIEGEL, 1974) beschrieben.

Eine Aufhebung der durch L-Leucin bewirkten Hemmung der Synthase-Aktivität durch L-Valin ist bisher nur für die Enzyme von Hydrogenomonas eutropha H 16 und Micrococcus denitrificans berichtet worden (HILL und SCHLEGEL, 1969a; WIEGEL, 1974).

Für Micrococcus denitrificans gründeten sich die Ergebnisse zunächst auf Untersuchungen an Rohextrakten der Zellen. Der Befund konnte jedoch auch am gereinigten Enzym bestätigt werden. Die durch L-Leucin bewirkte Hemmung ließ sich aufheben, wenn L-Valin in großem Überschuß gegenüber L-Leucin dem Testgemisch zugesetzt wurde. Von den daraufhin geprüften natürlichen Aminosäuren zeigte L-Isoleucin eine ähnliche Wirkung wie L-Valin. Gering aktivitätssteigernd wirken auch L-Methionin, L-Cystein und L-Phenylalanin. Ob der Wirkung der letztgenannten Aminosäuren eine physiologische Bedeutung zuzumessen ist, bleibt noch ungeklärt. Zumindest für L-Isoleucin ist dieses in Betracht zu ziehen. Für L-Methionin, L-Cystein und L-Phenylalanin kann jedoch vermutet werden, daß die teilweise Aufhebung der durch L-Leucin verursachten Hemmung ihrer „zufälligen" strukturellen Ähnlichkeit mit L-Leucin zuzuschreiben ist. Daß Cystein, Norvalin und Norleucin beim ungehemmten Enzym eine geringe Hemmung hervorrufen, beim durch L-Leucin gehemmten Enzym aber eine geringe Aktivitätssteigerung bewirken, steht mit der Vorstellung einer Konkurrenz dieser Verbindungen zu L-Leucin um die Bindungsstelle(n) im Einklang.

Einen interessanten Aspekt bietet die Unspezifität der α-Isopropylmalat-Synthase bezüglich ihrer Substrate. Bei allen daraufhin untersuchten IPM-Synthasen konnte gezeigt werden, daß das Enzym außer KIV die α-Ketosäuren Pyruvat, α-Ketobuttersäure und n-Ketovaleriansäure umsetzt (CALVO et al., 1962; STRASSMANN et al., 1964; KOHLHAW und UMBARGER, 1965; WEBSTER und GROSS, 1965; RABIN et al., 1968; HILL, 1968; SAI et al., 1969; BAUMGARTEN, 1969, WIEGEL, 1974).
Dabei wurden mit Pyruvat oder α-Ketobuttersäure oft höhere Umsatzraten als mit KIV erzielt, doch zeigte KIV stets die höchste Affinität zum Enzym (Tab. 14), es wird daher als „natürliches"

Substrat der IPM-Synthase angesehen.

Tab. 14 Vergleich aus der Literatur entnommener (app.) $K_m$- und rel. $v_{max}$-Werte für die α-Ketosäuren

| α-Ketosäure | WEBSTER und GROSS, 1965 Neurospora crassa | | KOHLHAW et al., 1969 Salmonella typhimurium | | WIEGEL 1974 Hydrogenomonas eutropha H 16 | | ULM et al. 1971 Saccharomyces spec. | | SAI et al. 1969 Saccharomyces carlsbergensis | | Micrococcus denitrificans | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | app.$K_m$ (M) | rel. $v_{max}$ | app.$K_m$ (M) | rel. $v_{max}$ | $K_{0,5}$ (M) | rel. $v_{max}$ | app.$K_m$ (M) | rel. $v_{max}$ | app.$K_m$ (M) | rel. $v_{max}$ | app.$K_m$ (M) | rel. $v_{max}$ |
| α-Ketoisovaleriansäure | $1x10^{-5}$ | 1 | $6x10^{-5}$ | 1 | $6x10^{-5}$ | 1 | $2,6x10^{-5}$ | 1 | $1,6x10^{-5}$ | 1 | $2,8x10^{-5}$ | 1 |
| Brenztraubensäure | $5,8x10^{-3}$ | - | $1x10^{-2}$ | 1,5 | $1x10^{-2}$ | 1 | $2,3x10^{-3}$ | 2,6 | $2x10^{-4}$ | 0,59 | $4x10^{-3}$ | 2,2 |
| α-Ketobuttersäure | $2,1x10^{-3}$ | >1 | $1,1x10^{-3}$ | 3 | $1,8x10^{-3}$ | 3,4 | - | - | $5,7x10^{-4}$ | 4,16 | $2x10^{-4}$ | 2,8 |
| n-Ketovaleriansäure | - | - | - | 0,3 | $5x10^{-4}$ | 0,6 | - | - | - | - | $4x10^{-4}$ | 0,5 |

WIEGEL (1974) konnte weiterhin für das Enzym aus Hydrogenomonas eutropha H 16 nachweisen, daß auch eine Reihe von Homologen und Analogen des Acetyl-CoA mit α-Ketosäuren umgesetzt werden. Die IPM-Synthase aus Micrococcus denitrificans setzte die aufgeführten α-Ketosäuren ebenfalls um. Auch für Acyl-CoA-Verbindungen erwies das Enzym sich unspezifisch. Eine Kondensation der α-Ketosäuren wurde sowohl mit Acetyl-CoA als auch mit Propionyl-CoA erzielt, doch wiesen auch bei diesem Enzym KIV und Acetyl-CoA die jeweils höchste Affinität zur IPM-Synthase auf.

Für die Enzyme der Leucin-Biosynthese aus Saccharomyces cerevisae konnte eine Beteiligung an der Bildung von Gärungsfuselölen nachgewiesen werden (INGRAHAM und GUYMON, 1960; INGRAHAM et al., 1961, WEBB und INGRAHAM, 1963; GUYMON, 1966). REH (unveröffentl. Ergebnisse) machte weiterhin die Leucin-Biosyntheseenzyme für die Bildung von α-Ketobuttersäure aus Pyruvat und Acetyl-CoA in einer Revertante einer isoleucin-auxotrophen Mutante von Hydrogenomonas eutropha H 16 verantwortlich, die trotz fehlender Threonindesaminase ohne Supplemente zu wachsen vermochte. Doch fehlen bislang Hinweise darauf, ob der Unpezifität der IPM-Synthase generell

eine Bedeutung für den Stoffwechsel der Mikroorganismen zuzumessen ist.

Mit Hilfe leucin-auxotropher Mutanten konnte gezeigt werden, daß die drei spezifischen Enzyme des herkömmlichen Leucin-Biosyntheseweges bei allen daraufhin untersuchten Organismen von vier Genen codiert werden (JUNGWIRTH et al., 1963; BURNS et al, 1963; SATYANARAYANA et al., 1968a; UMBARGER, 1969).

Transduktionsexperimente an leucinbedürftigen Mutanten erbrachten, daß die vier Strukturgene von Salmonella typhimurium in einem Operon liegen (MARGOLIN, 1959; 1963). Die Synthese der drei Enzyme wird durch L-Leucin koordiniert reprimiert (BURNS et al., 1966).

Die vier Strukturgene der Biosynthese-Enzyme des Leucins in Neurospora crassa sind dagegen nicht in einem Operon verbunden (GROSS und GROSS, 1961). Auch die Regulation der Enzymsynthese unterscheidet sich von derjenigen in Bakterien. Nur die Synthese des Schlüsselenzyms, der α-Isopropylmalat-Synthase, wird durch L-Leucin reprimiert. Die Bildung der beiden folgenden Enzyme, Isopropylmalat-Isomerase und β-Isopropylmalat-Dehydrogenase, wird durch α-Isopropylmalat induziert (GROSS, 1965).

Eine weitere Variation des Regulationsmusters liegt in Saccharomyces cerevisae vor. Die α-Isopropylmalat-Synthase wird nur in Gegenwart von Threonin und Leucin reprimiert (SATYANARAYANA et al., 1968b).

Die Bildung der Enzyme in Hydrogenomonas eutropha H 16 (HILL und SCHLEGEL, 1969) und Arthrobacter St. 23 (BAUMGARTEN, 1969) unterliegt einer Repression durch Leucin.

Für Micrococcus denitrificans konnte ebenfalls gezeigt werden, daß die α-Isopropylmalat-Synthase durch das Endprodukt des Syntheseweges reprimiert wird. Zellen, die mit einem Zusatz von 5 mM Leucin zum Nährmedium angezogen wurden, wiesen gegenüber in einfachem Medium gezogenen nur 50 % der Enzymaktivität auf. Threoninzusätze zum Nährmedium wirkten sich dagegen nicht auf die Synthese des Enzyms aus.

Die bakteriostatische Wirkung von Antimetaboliten beruht auf ihrer großen strukturellen Ähnlichkeit mit den natürlichen Metaboliten. Selbst hochspezifische Enzymproteine können ihre natür-

lichen Substrate oder Effektoren oft nicht von strukturanalogen Verbindungen unterscheiden. So werden Antimetaboliten zwar in die Zelle aufgenommen und in den Stoffwechsel eingeschleust, führen aber aufgrund ihrer Unfähigkeit, alle Funktionen der normalen Metaboliten zu erfüllen, zu Fehlleistungen in der Zelle, die an einer Wachstumshemmung erkennbar sind.

Resistente Mutanten sind gegen fast alle bekannten Aminosäuremetaboliten isoliert worden. Für das Auftreten einer Resistenz führt MOYED (1964) vier mögliche Veränderungen des Stoffwechsels als Ursache an. Danach kann die Resistenz durch a) eine defekte Aufnahme in die Zelle, b) durch bevorzugten Abbau, c) durch einen defekten Einbau des Antimetaboliten in das Zellprotein oder d) durch eine defekte Regulation der Biosynthese des Metaboliten bedingt sein.

Von besonderem Interesse sind die Mutanten, deren Resistenz gegen Antimetaboliten auf einer veränderten Regulation eines Biosyntheseweges beruht. Oft zeichnen sich diese Mutanten durch Überproduktion und Ausscheidung der natürlichen Metaboliten aus, so daß eine gezielte Selektion möglich ist (ADELBERG, 1958).

In der Literatur sind einige Antimetaboliten beschrieben worden, die antagonistisch zum L-Leucin wirken (LONCRINI, 1956; BROWN, 1967; SMITH et al., 1963). Eingehend untersucht worden ist besonders die bacteriostatische Wirkung des Trifluorleucins, das erstmals von LONCRINI (1956) synthetisiert wurde. Der Antimetabolit wirkt bei Salmonella typhimurium (CALVO und UMBARGER, 1964), Neurospora crassa (WEBSTER und GROSS, 1965), Hydrogenomonas eutropha H 16 (HILL, 1968) und Saccharomyces spec. (SATYANARAYANA et al., 1969) wachstumshemmend. Bei allen genannten Organismen beruht die bakteriostatische Wirkung des Trifluorleucins auf einer Hemmung der α-Isopropylmalat-Synthase, deren natürlicher Inhibitor das Leucin ist. Eine solche Hemmung wurde von MOYED (1960a) als „false feedback-inhibition" bezeichnet.

Von allen aufgeführten Mikroorganismen wurden trifluorleucin-resistente Mutanten isoliert, deren α-Isopropylmalat-Synthase nicht mehr durch L-Leucin hemmbar ist.
Von Hydrogenomonas eutropha H 16 (HILL und SCHLEGEL, 1969), sowie Salmonella typhimurium (CALVO und UMBARGER, 1964; BURNS et al., 1966) wurden weiterhin trifluorleucin-resistente Mutanten isoliert, die das durch Endprodukthemmung kontrollierte Enzym, die α-Isopropylmalat-Synthase, konstitutiv bilden.
CALVO und CALVO (1967) „konstruierten" durch Transduktion eine Doppelmutante von Salmonella typhimurium, die eine durch Leucin nicht mehr hemmbare α-Isopropylmalat-Synthase konstitutiv bildete. Diese Mutante wandelt mehr als 50 % der als C-Quelle zugesetzten Glucose in L-Leucin um und scheidet die Aminosäure in das Nährmedium ab.
HILL und SCHLEGEL (1969a) isolierten von einer isoleucin- und einer isoleucin- und valin-auxotrophen Mutante prototrophe Revertanten. Die Revertanten bilden die Acetohydroxysäure-Synthase konstitutiv oder bilden ein verändertes Enzym mit geringer Empfindlichkeit für Valin. Sie schieden Valin aus und erwiesen sich als resistent gegenüber Konzentrationen an Trifluorleucin, die das Wachstum des Wildtyps vollständig unterdrücken.
Eine Erklärung findet diese Resistenz in dem Befund, daß L-Valin die von L-Leucin und Trifluorleucin bewirkte Hemmung der α-Isopropylmalat-Synthase aufhebt (HILL, 1968).

Bei Escherichia coli bewirkt Trifluorleucin eine Verlängerung der lag-Phase (RENNERT und ANKER, 1963). Die Zellen wachsen danach jedoch mit annähernd normaler Rate. Leucin-auxotrophe Mutanten bauten darüberhinaus Trifluorleucin anstelle von Leucin in das Protein ein, wenn sie unter allmählicher Erhöhung des Trifluorleucin-Leucin-Verhältnisses in kontinuierlicher Kultur gezogen wurden. Adaptierte Zellen konnten ihren Leucinbedarf vollständig durch Trifluorleucin decken. Die Ursachen dieser phänotypischen Resistenz sind noch ungeklärt (RENNERT und ANKER, 1963). Über eine ähnliche phänotypische Resistenz bei Salmonella typhimurium gegen Azaleucin ist von STIEGLITZ und CALVO (1971) berichtet worden.

HILL und SCHLEGEL (1969) zeigten, daß Micrococcus denitrificans gegen 1 mM Trifluorleucin resistent ist. Untersuchungen von FISCHER (1973) ergaben, daß diese Resistenz auf der geringen Affinität des Trifluorleucins zur α-Isopropylmalat-Synthase beruht. Eine maximale Hemmung der Aktivität des Enzyms wurde erst durch Konzentrationen von mehr als 10 mM Trifluorleucin erreicht, während bereits 1 mM an L-Leucin eine Hemmung von annähernd 90 % bewirkten.
Die Einführung der Trifluormethylgruppe anstelle des Methylrestes in das Leucin hat nur eine geringfügige Vergrößerung des Moleküls zur Folge (BROCKWAY, 1937). Der pK-Wert der Aminosäure verändert sich jedoch durch den starken induktiven Effekt des Substituenten (WALBORSKY und LANG, 1957). Die geringe Affinität des Trifluorleucins zum Enzym könnte darin ihre Ursache finden.
Azaleucin bewirkte ebenfalls erst in hohen Konzentrationen eine Hemmung des Enzyms. Sowohl Trifluorleucin als auch Azaleucin unterdrückten auch in hohen Konzentrationen das Wachstum von Micrococcus denitrificans nur vorübergehend; die Zellen waren in der Lage, sich an die Antimetaboliten zu adaptieren.

Die Resistenz vieler antimetabolit-unempfindlicher Mutanten beruht auf einer Überproduktion des natürlichen Metaboliten. Der Metabolit wirkt kompetitiv zum Antimetaboliten und hebt die Wachstumshemmung auf.
Die Fähigkeit zur Erhöhung der Syntheseleistung besitzt auch der Wildtyp. Während die Enzyme des Anabolismus in normal gezogenen Zellen nur mit geringen Aktivitäten vorliegen, können sie unter bestimmten Bedingungen mit erhöhter Rate gebildet werden. Durch die Derepression der Enzymsynthese ist der Wildtyp zur Adaption an manche Antimetaboliten befähigt. MOYED (1960b) bezeichnete diese Erscheinung als „induzierte phänotypische Resistenz". Charakteristisch für diese Resistenz ist, daß die Derepression der Enzymsynthese nicht konstitutiv ist. Nach längerem Wachstum ohne Metabolit-Zusatz wird der Wildtyp wieder gegen den Antimetaboliten empfindlich.

Über die wachstumshemmende Wirkung der 2-Aminobuttersäure bei verschiedenen Mikroorganismen ist mehrfach berichtet worden (GLADSTONE, 1939; FRIEDMANN, 1955; FREUNDLICH und CLARKE, 1968; BAUMGARTEN, 1959). Sie beruht auf der strukturellen Ähnlichkeit mit L-Valin und kann durch den natürlichen Metaboliten aufgehoben werden.
Die Wildtypzellen von Escherichia coli W und Arthrobacter St. 23 sind in der Lage, sich an Aminobuttersäure zu adaptieren. Der Zusatz des Antimetaboliten zum Nährmedium führt zwar zunächst zu einer vollständigen Wachstumshemmung, doch setzt nach einer lag-Phase, in der die Syntheserate der Acetohydroxysäure-Synthase erhöht wird, das Wachstum der Bakterienpopulationen wieder ein. BAUMGARTEN (1969) wies in der Übergangsphase bei Arthrobacter St. 23 eine ebenfalls erhöhte Aktivität der α-Isopropylmalat-Synthase nach.

Entsprechende Versuche wurden an Micrococcus denitrificans durchgeführt, um Zellen mit erhöhter Aktivität der α-Isopropylmalat-Synthase zu erhalten. Es zeigte sich, daß Micrococcus denitrificans gegen den Antimetaboliten empfindlich ist und sich ähnlich wie Arthrobacter St. 23 und Escherichia coli zu adaptieren vermag. Doch konnte keine gesteigerte Synthese der α-Isopropylmalat-Synthase nachgewiesen werden. Dieser Befund deutet darauf hin, daß die durch Aminobuttersäure bewirkte Hemmung der Acetohydroxysäure-Synthase (FREUNDLICH und CLARKE, 1968; BAUMGARTEN, 1969) auch in Gegenwart hoher Konzentrationen des Antimetaboliten nicht vollständig ist. Der Durchsatz an Metaboliten in der Synthesekette des Leucins ist für die Synthese dieser Aminosäure ausreichend. Ursache der beobachteten Wachstumshemmung kann nach FREUNDLICH und CLARKE (1968) weiterhin eine kompetitive Hemmung der Valin-Aktivierung durch den Antimetaboliten sein.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die α-Isopropylmalat (IPM)-Synthase aus Micrococcus denitrificans, Stamm Morris, wird durch Repression und Derepression ihrer Biosynthese reguliert. Während einer Wachstumsperiode liegt die höchste spezifische Aktivität (ca. 12 E/g Protein) gegen Ende der logarithmischen Phase vor. Zusätze von L-Leucin bewirkten eine Repression der IPM-Synthase auf 40 % der normalen Aktivität; Valin, Isoleucin und Threonin zeigten dagegen keinen Einfluß auf die Synthese des Enzyms.

2. 2-Aminobuttersäure hemmt das Wachstum von Micrococcus denitrificans; doch sind die Zellen in der Lage, sich an den Antimetaboliten zu adaptieren. Die Adaptation ist nicht mit einer erhöhten Bildung der IPM-Synthase verbunden.

3. Hohe Konzentrationen von 5',5',5'-Trifluorleucin (20 mM) oder 4-Azaleucin (10 mM) bewirken bei Micrococcus denitrificans ebenfalls eine vorübergehende Wachstumshemmung. Die Wirkung der Antimetaboliten konnte auf eine „false feedback-inhibition" der IPM-Synthase zurückgeführt werden.

4. Es wurde eine Methode ausgearbeitet, die eine gezielte Anreicherung und Isolierung auxotropher Mutanten von Micrococcus denitrificans erlaubt. Die Mutationsauslösung erfolgte mit NG; eine Anreicherung der Mutanten wurde durch wiederholte Abtötung wachsender Wildtypzellen mit Ampicillin erreicht.

5. Von Micrococcus denitrificans wurden Mutanten isoliert, die für die verzweigten Aminosäuren auxotroph waren. Aufgrund von enzymatischen Untersuchungen, Kreuzfütterungstests und Ermittlung des Supplinbedürfnisses ließen die Mutanten sich in vier Gruppen klassifizieren.

6. Ausgehend von einer für Valin und Isoleucin auxotrophen Mutante wurden nach erneuter Mutationsauslösung 20 Mutanten isoliert, die einen zusätzlichen Defekt in der Leucin-Biosynthese

aufwiesen.

7. Eine doppelt blockierte Mutante, die für Valin, Isoleucin und Leucin auxotroph war, wurde unter Supplementbegrenzung angezogen. Durch die Derepressionsbedingungen ließ sich in den Mutanten eine gegenüber Wildtypzellen 30 - 50fach gesteigerte Bildung der IPM-Synthase erreichen.

8. Aus Rohextrakten der Zellen wurde die IPM-Synthase durch Fraktionierung der Extrakte (Gelfiltration, Ionenaustauscherchromatographie) bis zu einer spezifischen Aktivität von 6 800 E/g Protein angereichert.

9. Die gereinigte IPM-Synthase war bei niederen Temperaturen sehr labil. In der Kälte inaktiviertes Enzym ließ sich jedoch durch Inkubation bei Raumtemperatur weitgehend reaktivieren. Das Substrat α-Ketoisovalerat wirkte in der Kälte stabilisierend.

10. Durch Gelfiltration wurde für die IPM-Synthase ein Molekulargewicht von 96 000 bestimmt, Elektrophorese in Porengrößegradientengelel ergab ein Molekulargewicht von 94 000. Gelelektrophoretische Trennungen zeigten, daß das Enzym zumindest aus zwei Untereinheiten besteht.

11. Die IPM-Synthase stellt einen Metall-Protein-Komplex dar; sowohl für die katalytische Aktivität als auch für die Stabilität des Enzyms sind $Mn^{++}$-Ionen erforderlich.

12. Das pH-Optimum für die von der IPM-Synthase katalysierten Reaktion lag in Diäthylamin/HCl-Puffer bei pH 9,5. In Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) wurde für das Substrat α-Ketoisovalerat ein $K_m$-Wert von $2{,}8 \times 10^{-5}$ M, für Acetyl-CoA von $1 \times 10^{-4}$ M, bestimmt. Beide Substratsättigungskurven entsprachen einer Michaelis-Menten-Kinetik.

13. Die Substratspezifität der IPM-Synthase ist sowohl für die α-Ketosäure als auch für die Acyl-Verbindung gering. Das Enzym setzte außer α-Ketoisovalerat die Ketosäuren Pyruvat, α-Ketobutyrat und n-Ketovalerat sowohl mit Acetyl-CoA als auch mit Propionyl-CoA um. Für Pyruvat und α-Ketobutyrat wurden höhere Umsatzgeschwindigkeiten als mit α-Ketoisovalerat bestimmt.

14. Die Aktivität der IPM-Synthase ließ sich durch das Endprodukt des Biosyntheseweges, L-Leucin, bis zu 90 % hemmen. Die Strukturanalogen DL-Trifluorleucin und 4-Azaleucin wirkten ebenfalls als Inhibitoren. L-Leucin wirkte gegenüber α-Ketoisovalerat nicht kompetitiv, gegenüber Acetyl-CoA teilweise kompetitiv. Die Hemmung des Enzyms war stark vom pH-Wert abhängig.

15. Die Hemmung der IPM-Synthase durch L-Leucin konnte durch andere strukturverwandte Aminosäuren aufgehoben werden. Aktivitätssteigernd waren insbesondere L-Valin und L-Isoleucin, doch hoben auch DL-Norleucin, DL-Norvalin, L-Cystein, L-Methionin und L-Phenylalanin die Hemmung teilweise auf. Das Ausmaß der Hemmung der IPM-Synthase war vom jeweiligen Verhältnis zwischen negativem und positivem Effektor abhängig.

16. Das Produkt CoA-SH der enzymatisch katalysierte Reaktion inaktiviert die IPM-Synthase. Das Substrat α-Ketoisovalerat schützte vor der Inaktivierung, kann bereits inaktiviertes Enzym aber nicht reaktivieren. Eine mögliche physiologische Bedeutung dieser in vitro gewonnenen Befunde wurde diskutiert.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS


ABELSON, P. H.
VOGEL, H. J. 1955 Aminoacid biosynthesis in Torulopsis utilis and Neurospora crassa. J. Biol. Chem. 213, 355.

ADELBERG, E. A. 1958 Selection of bacterial mutants which excrete antagonist of antimetabolites. J. Bact. 76, 326.

ALLISON, M. J.
BRYANT, M. P.
DOETSCH, R. N. 1962 Studies on the metabolic function of branched chain volatile fatty acids, growth factors for Ruminococci. I. Incorporation of isovalerate into leucine. J. Bact. 83, 523 - 532.

ALLISON, M. J.
BUCKLIN, J. A.
ROBINSON, J. M. 1966 Importance of the isovalerate carboxylatic pathway of leucine biosynthesis in the rumen. Appl. Microbiol. 14, 807 - 814.

ALLISON, M. J.
PEEL, J. L. 1971 The Biosynthesis of Valine from Isobutyrate by Peptostreptococcus elsdenii and Bacteroides ruminicola. Biochem. J. 121, 431 - 437.

ANDREW, L. G.
MORRIS, J. G. 1965 The biosynthesis of alanine by C. kluyveri. Biochim. biophys. Acta 97, 176 - 179.

ANDREWS, P. 1962 Estimation of Molecular Weights of Proteins by Gel-Filtration. Nature 196, 36 - 39-

ARGOUDELIS, A. D.
HERR, R. R.
MASON, D. J.
PYKE, T. R.
ZIERSERL, J. F. 1967 New amino acids from Streptomyces. Biochemistry 6, 165 - 170.

BACHOFEN, R.
BUCHANAN, B. B.
ARNON, D. I. 1964 Ferredoxin as a reductant in pyruvate synthesis by a bacterial extract. Proc. natn. Acad. Sci. USA 51, 690 - 694.

BANERJEE, A. K. 1965 Physiologische Untersuchungen an Micrococcus denitrificans Beij. und auxotrophen Mutanten. Diss. Göttingen

BAUMGARTEN, J. 1969 Die Regulation der Synthese von Isoleucin, Valin und Leucin bei Arthrobacter St. 23. Diss. Göttingen.

BAUMGARTEN, J. 1972 Die Bildung von Isoleucin durch Mutanten von Arthrobacter unter variierten Wachstumsbedingungen. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 220, 308 - 315.

BARTHOLOMEW, J. C. 1971 α-Isopropylmalate synthase from Salmonella typhimurium. Carboxypeptidase digestion studies of parent and feedback-insensitive enzymes. Biochim. Biophys. Acta 250, 568 - 576.

BARTHOLOMEW, J. C. 1971 α-Isopropylmalate Synthase from Salmonella typhimurium-Amino acid composition, $NH_2$-terminal analysis, and fingerprint analysis. Biochim. Biophys. Acta 250, 577 - 587.

BEISENHERZ, G. 1953 Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. Z. Naturf. 8B, 555 - 557.

BOLZE, H. J.
BÜCHER, Th.
CZOK, R.
GARBADE, H. K.
MEYER-ARENDT, E.
PFLEIDERER, G.

BERGMEYER, H. U. 1955 Zur Messung von Katalase-Aktivitäten. Biochem. Z. 327, 255 - 258.

BROCKWAY, L. O. 1937 The structures of the fluorochlormethanes and the effect of bond type on chemical reactivity. J. Phys. Chem. 41, 185 - 195.

BROWN, R. R. 1967 Aminoaciduria resulting from cycloleucine administration in man. Science 157, 432 - 434.

BURNS, R. O. 1963 The biosynthesis of leucine. III. The conversion of α-hydroxy-β-carboxyisocaproate to α-ketoisocaproate. Biochemistry 2, 1053 - 1058.

UMBARGER, H. E.
GROSS, S. R.

BURNS, R. O.
CALVO, J. M.
MARGOLIN, P.
UMBARGER, H. E.
1966 The expression of the leucine operon.
J. Bact. 91, 1570 - 1576.

CALVO, J. M.
KALYANPUR, M. G.
STEVENS, C. M.
1962 2-Isopropylmalate and 3-Isopropylmalate as intermediates in leucine biosynthesis.
Biochemistry 1, 1157 - 1161.

CALVO, J. M.
UMBARGER, H. E.
1963 Feedback control of leucine biosynthesis in Salmonella typhimurium.
Bacteriol. Proc., S. 126.

CALVO, J. M.
UMBARGER, H. E.
1964 Mutants of Salmonella typhimurium constitutive for leucine biosynthetic enzymes.
Federation Proc. 23, 377.

CALVO, R. A.
CALVO, J. M.
1967 Lack of end-product inhibition and repression of leucine synthesis in a strain of Salmonella typhimurium.
Science 156, 1107 - 1109.

CALVO, J. M.
FREUNDLICH, M.
UMBARGER, H. E.
1969 Regulation of branched-chain amino acid biosynthesis in Salmonella typhimurium: Isolation of regulatory mutants.
J. Bact. 97, 1272 - 1282.

CALVO, J. M.
BARTHOLOMEW, J. C.
STIEGLITZ, B. I.
1969 Fluorometric assay of enzymatic reactions involving acetyl coenzym A in aldol condensations.
Anal. Biochem. 28, 164 - 181.

CANOVAS, J. L.
RUIZ-AMIL, M.
LOSADA, M.
1965 Condensation of α-ketobutyrate and acetyl-CoA in Baker´s yeast.
Arch. Mikrobiol. 50, 164 - 170.

CERDA-OLMEDO, E.
HANAWALT, P. C.
1968 Diazomethane as the active agent in nitroguanidine mutagenesis and lethality.
Molec. gen. Genetics 101, 191 - 202.

DAVIS, B. D.
1948 Concentration of biochemically deficient mutants of bacteria by penicillin.
J. Am. Chem. Soc. 70, 4267 - 4268.

| | | |
|---|---|---|
| DEMAIN, A. L. | 1971 | Increasing enzyme production by genetic and environmental manipulations. In: Methods of Enzymology, Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. (edts.). Acad. Press New York-London 22, 86 - 95. |
| DIXON, M.<br>WEBB, E. C. | 1964 | Enzymes. Longmans, 2nd Ed., London. |
| EGGERER, H.<br>KLETTE, A. | 1967 | Über das Katalysenprinzip der Malat-Synthase. Eur. J. Biochem. 1, 447 - 475. |
| ELLMANN, C, L. | 1959 | Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. 82, 70 - 77. |
| EVANS, M. C. W.<br>BUCHANAN, B. B. | 1965 | Photoreduction of ferredoxin and its use in carbon dioxide fixation by a subcellular system from a photosynthetic bacterium. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 53, 1420-1425. |
| FISCHER, H. F. | 1973 | Reinigung der α-Isopropylmalat-Synthase aus Micrococcus denitrificans und enzymkinetische Messungen. Diplomarbeit Göttingen. |
| FREUNDLICH, M.<br>BURNS, R. O.<br>UMBARGER, H. E. | 1962 | Control of isoleucine, valine, and leucine biosynthesis. I. Multivalent repression. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 48, 1804-1808. |
| FREUNDLICH, M.<br>CLARKE, L. P. | 1968 | Control of isoleucine, valine, and leucine biosynthesis. V. Dual effect of α-aminobutyric acid on repression and endproduct inhibition in Escherichia coli. Biochim. Biophys. Acta 170. 271 - 281. |
| GROSS, S. R.<br>GROSS, H. S. | 1961 | Some features of complementation at the leucine-4-locus of Neurospora. Genetics 46, 468 - 469. |

GROSS, S. R.
JUNGWIRTH, C.
UMBARGER, H. E.
1962
Another intermediate in leucine biosynthesis.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 7, 5 - 9.

GROSS, S. R.
BURNS, R. O.
UMBARGER, H. E.
1963
The biosynthesis of leucine. II. The enzymic isomerization of β-carboxy-β-hydroxysocaproate.
Biochemistry 2, 1046 - 1052.

GROSS, S. R.
1965
The regulation of synthesis of leucine biosynthetic Enzymes in Neurospora.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 54, 1538 - 1546.

GYUMON, J. F.
1966
Mutant strains of Saccharomyces cerevisae applied to studies in higher alcohol formation during fermentation.
Developments in Industrial Microbiology, Vol. 7, 88 - 96.

HALPERN, Y. S.
UMBARGER, H. E.
1959
Evidence for two distinct enzyme systems forming acetolactate in Aerobacter aerogenes.
J. Biol. Chem. 234, 3067 - 3071.

HEGEMANN, G. D.
1966
Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by Pseudomonas putida. II. Isolation and Properties of blocked mutants.
J. Bact. 91, 1155 - 1160.

HILL, F. F.
1968
Regulation der Leucinsynthese und Trifluorleucinresistenz bei Hydrogenomonas H 16.
Diss. Göttingen.

HILL, F. F.
SCHLEGEL, H. G.
1969a
Die α-Isopropylmalat-Synthetase bei Hydrogenomonas H 16.
Arch. Mikrobiol. 68, 1 - 17.

HILL, F. F.
SCHLEGEL, H. G.
1969b
Regulationsdefekte bei trifluorleucinresistenten Mutanten von Hydrogenomonas H 16.
Arch. Mikrobiol. 68, 17 - 31.

HOLLIDAY, R.
1956
A new method for the identification of biochemical mutants of microorganisms.
Nature 178, 987.

HOOD, W.
COAR, N. G.
1972 Branched-chain Amino Acid Biosynthesis in Blue-green Alga Anabena variabilis.
J. Gen. Microbiol. 73, 417 -426.

HORVATH, J.
VARGA, J. M.
SZENTIRMAI, A.
1964 Control of valine and isoleucine metabolism in Pseudomonas aeruginosa and Escherichia coli.
J. Gen. Microbiol. 34, 241 - 248.

HORVATH, J.
SZENTIRMAI, A.
ZSADANYI, J.
1967 Induced phenotypic resistance to valine in Mycobacterium pellegrino.
J. Bact. 94, 850 - 855.

IMAI, K.
REEVES, H. C.
AJE, S. J.
1963 n-Propylmalate synthetase.
J. Biol. Chem. 238, 3193 - 3198.

INGRAHAM, J. L.
GUYMON, J. F.
1960 The formation of higher aliphatic alcohols, by mutant strains of Saccharomyces cerevisae.
Arch. Biochem. Biophys. 88, 157 - 166.

INGRAHAM, J. L.
GUYMON, J. F.
CROWELL, E. A.
1961 The pathway of formation of n-butyl and n-amyl alcohols by a mutant strain of Saccharomyces cerevisae.
Arch. Biochem. Biophys. 95, 169 - 175.

JUNGWIRTH, C.
MARGOLIN, P.
UMBARGER, H. E.
GROSS, S. R.
1961 The initial step in leucine biosynthesis.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 5, 435 - 438.

JUNGWIRTH, C.
GROSS, S. R.
MARGOLIN, P.
UMBARGER, H. E.
1963 The biosynthesis of leucine.
I. The accumulation of β-carboxy-β-hydroxy-isocaproate by leucine auxotrophs of Salmonella typhimurium and Neurospora crassa.
Biochemistry 2, 1 - 6.

KAUDEWITZ, F.
1959 Inaktivierende und mutagene Wirkung salpetriger Säure auf Zellen von E. coli.
Z. Naturf. 14B, 528 - 537.

KOHLHAW, G.
LEARY, T. R.
UMBARGER, H. E.
1969 α-Isopropylmalate synthase from Salmonella typhimurium.
Purification and properties.
J. Biol. Chem. 244, 2218 - 2225.

KOHLHAW, G. 1970 Number and reactivity of the sulfhydrylgroups of α-isopropylmalate synthase of Salmonella typhimurium. Biochim. Biophys. Acta 212, 58 - 64.

KOHLHAW, G. 1971 Cross-linking of Salmonella isopropylmalate synthase with dimethyl supermidate: evidence for antagonist effects of leucine and acetyl-CoA on the quaternary structure. Biochem. Biophys. Res. Comm. 43, 741 - 746.
BOATMAN, G.

LEARY, T. R. 1970 Dissociation of α-isopropylmalate synthase from Salmonella typhimurium by its feedback inhibitor leucine. Biochem. Biophys. Res. Comm. 39, 494 - 501.
KOHLHAW, G.

LEDERBERG, J. 1948 Concentration of biochemical mutants of bacteria with penicillin. J. Am. Chem. Soc. 70, 4267 - 4268.
ZINDER, N. D.

LEDERBERG, J. 1952 Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. J. Bact. 63, 399 - 406.
LEDERBERG, E. M.

LEE, J. J. 1968 Protein aggregation. Biochem. J. 110, 465 - 470.
BERN , D. S.

LINGENS, F. 1964 Erzeugung und Untersuchung biochemischer Mangelmutanten von Saccharomyces cerevisae. Z. Naturf. 19B, 1058 - 1065.
OLTMANNS, O.

LONCRINI, D. F. 1956 Synthesis of w-trifluormethylamino acids. Doctoral Diss., Florida State Univ.

LOWRY, O. H. 1951 Protein measurement with the folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265 - 275.
ROSEBROUGH, N. J.
RANDALL, R. J.

LUBIN, M. 1962 Enrichment of auxotrophic mutant population by recycling. J. Bact. 83, 696 - 697.

MARAGOUDAKIS, H. E. 1967 Biosynthesis of α-isopropylmalic and citric acids in Acetobacter suboxydans. J. Bact. 94, 512 - 516.
STRASSMANN, M.

MARGOLIN, P. 1963 Genetic fine structure of the leucine operon in Salmonella. Genetics 48, 441 - 457.

MARGOLIS, J. KENRICK, K. G. 1968 Polyacrylamidgel electrophorism in a continuous molecular sieve gradient. Anal. Biochem. 25, 347 - 362.

MARTIN, W. R. COLEMAN, W. H. WIDBURG, N. E. CANTRELL, R. JACKSON, M. DENISON, F. W. 1962 β-Carboxy-β-hydroxyisocaproate formation by microorganisms. Biochim. Biophys. Acta 62, 139 - 146.

MAURER, H. R. 1968 Disk-Elektrophorese. Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamidgel-Elektrophorese. Walter de Gruyter & Co., Berlin.

MOYED, H. S. 1960a False feedback inhibition: inhibition of tryptophan biosynthesis by 5-methyltryptophan. J. Biol. Chem. 238, 257 - 268.

MOYED, H. S. 1960b Induced phenotypic resistance to antimetabolite. Science 131, 1449.

MOYED, H. S. 1964 Biochemical mechanism of drug resistance. Ann. Rev. Microbiol. 18, 347 - 366.

OAKS, A. 1965 The synthesis of leucine in maize embryos. Biochim. Biophys. Acta 111, 79 - 89.

OCHOA, S. 1955 Crystalline condensing enzyme from pig heart. In: Methods in Enzymology. Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. (edts.). Acad. Press N.Y. 1, 685 - 694.

PARSON, S. J. BURNS, R. O. 1969 Purification and properties of β-Isopropylmalate Dehydrogenase. J. Biol. Chem. 244, 996.

PEARCE, L. E. LOUTIT, J. S. 1965 Biochemical and genetic grouping of isoleucine-valine mutants of Pseudomonas aeruginosa. J. Bact. 89, 58 - 63.

PFENNIG, N.
LIPPERT, D.
1966 Über das Vitamin $B_{12}$-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien.
Arch. Mikrobiol. 55, 245 - 256.

RACKER, E.
1947 Spectrophotometric measurements of hexokinase and phosphohexokinase activity.
J. Biol. Chem. 167, 843 - 854.

RAMAKRISHNAN, T.
ADELBERG, E. A.
1965 Regulatory mechanisms in the biosynthesis of isoleucine and valine. II. Identification of two operator genes.
J. Bact. 89, 654 - 660.

RABIN, R.
REEVES, H. C.
AJL, S. J.
1963 β-ethylmalate synthetase.
J. Bact. 86, 937 - 944.

RABIN, R.
SALOMON, I. I.
BLEIWEIS, J. C.
SAMUEL, J. A.
1968 Metabolism of ethylmalic acids by Pseudomonas aeruginosa.
Biochemistry 7, 377 - 388.

REH, M.
1967 Regulation der Synthese von Isoleucin und Valin durch Hydrogenomonas H 16.
Diss. Göttingen

RENNERT, O. M.
ANKER, H. S.
1963 On the incorporation of 5'5'5'-trifluorleucine into proteins of Escherichia coli.
Biochemistry 2, 471 - 476.

RHAESE, H. J.
BOETKER, N. K.
1973 The Molecular Basis of Mutagenesis by Methyl and Ethyl Methanesulfonates.
Eur. J. Biochem. 32, 166 - 172.

ROBERTS, E.
ROUSER, G.
1958 Spectrophotometric assay for reaction of N-ethylmaleimid with sulfhydryl groups.
Anal. Chem. 30, 1291 - 1294.

ROBYT, H. J.
ACKERMANN, R. J.
CHITTENDEN, C. G.
1971 Reaction of protein disulfide groups with Ellman's reagent: a case study of the number of sulfhydryl and disulfide groups in Aspergillus oryzae α-amylase, papain and lysozyme.
Arch. Biochem. Biophys. 147, 262 - 269.

RUDMAN, D.
MEISTER, A.
1953 Transamination in Escherichia coli.
J. Biol. Chem. 200, 591 - 604.

SAI, T.
AIDA, K.
UEMURA, T. 1969 Studies on (-)-citramalic acid formation by respiration-deficient yeast mutants. V. Purification and some properties of citramalate condensing enzyme.
J.Gen.Appl.Microbiol. 15, 345 - 363.

SATYANARAYANA, T.
UMBARGER, H. E.
LINDEGREN, G. 1968a Biosynthesis of branched-chain amino acids in Yeast: correlation of biochemical blocks and genetic lesions in leucine auxotrophs.
J. Bact. 96, 2012 - 2017.

SATYANARAYANA, T.
UMBARGER, H. E.
LINDEGREN, G. 1968b Biosynthesis of branched-chain amino acids in Yeast: regulation of leucine biosynthesis in phototrophic and leucine auxotrophic strains.
J. Bact. 96, 2018 - 2024.

SCHLEGEL, H. G.
KALTWASSER, H.
GOTTSCHALK, G. 1961 Ein Submersverfahren zur Kultur wasserstoffoxydierender Bakterien: Wachstumsphysiologische Untersuchungen.
Arch. Mikrobiol. 49, 209 - 222.

SCHLEGEL, H. G.
SCHUSTER, E.
REH, M.
METZ, H. 1965 Die Abtötung wachsender Hydrogenomonaszellen durch Colistin.
Zbl. Bakt. II. 119, 225 - 231.

SMITH, S. 1971 The effeckt of $^{2}H_{2}O$ on the quaternary structure of the fatty acid synthetase multienzyme complex.
Biochim. Biophys. Acta 251, 477 - 481.

SMITH, S.
ABRAHAM, S. 1971 Fatty acid synthetase from lactating rat mammary gland. II. Studies on the termination sequence.
J. Biol. Chem. 246, 2537 - 2542.

SMITH, S. S.
BAYLIS, N. L.
McCORD, T. J. 1963 The synthesis and biological activities of some aza analogs of amino acids. I. 4-Azaleucine, an inhibitory analog of leucine.
Arch. Biochem. Biophys.102, 313-315.

STADTMAN, E. R. 1966 Allosteric regulation of enzyme activity.
Ady. Enzym. 28, 41 - 154.

STIEGLITZ, B. I.
CALVO, J. M. 1971 Effect of 4-Azaleucine upon leucine metabolism in Salmonella typhimurium.
J. Bakt. 108, 95 - 104.

| | | |
|---|---|---|
| STIEGLITZ, B. I.<br>CALVO, J. M. | 1974 | Distribution of the isopropylmalate pathway to leucine among diverse bacteria.<br>J. Bakt. 118, 935 - 941. |
| STRASSMANN, M.<br>LOCKE, L. A.<br>THOMAS, A. J.<br>WEINHOUSE, S. | 1955 | A study of leucine biosynthesis in Torulopsis utilis.<br>Science 121, 303 - 304. |
| STRASSMANN, M.<br>LOCKE, L. A.<br>THOMAS, A. J.<br>WEINHOUSE, S. | 1956 | A study of leucine biosynthesis in Torulopsis utilis.<br>J. Amer. Chem. Soc. 78, 1599 - 1602. |
| STRASSMANN, M.<br>CECI, L. N. | 1963 | Enzymatic formation of α-isopropylmalic acid, an intermediate in leucine biosynthesis.<br>J. Biol. Chem. 238, 2445 - 2453. |
| STRASSMANN, M.<br>CECI, L. N. | 1967 | A study of acetyl-Co A condensation with α-keto acids.<br>Arch. Biochem. Biophys. 119, 420-428. |
| TEIPEL, J.<br>KOSHLAND, D. E., jr. | 1969 | The significance of intermediary plateau regions in enzyme saturation curves.<br>Biochemistry 8, 4656 - 4663. |
| TENG-LEARY, E.<br>KOHLHAW, G. B. | 1975 | Binding of α-ketoisovalerate to α-isopropylmalate synthase. Half-of-the-sites and all-of-the sites availability.<br>Biochim. Biophys. Acta 410, 210 - 219. |
| TRACY, J. W.<br>KOHLHAW, G. B. | 1975 | Reversible, Coenzyme-A-mediated inactivation of biosynthetic condensing enzymes in yeast: A possible regulatory mechanism.<br>Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 1802 - 1806. |
| ULM, E. H.<br>BÖHME, R.<br>KOHLHAW, G. | 1971 | α-Isopropylmalate synthase from yeast: Purification, kinetic studies and effect of ligands on stability.<br>J. Bact. 110, 1118 - 1126. |
| UMBARGER, H. E.<br>SIU, P. L. M.<br>CALVO, J. M.<br>FREUNDLICH, M. | 1965 | The end product sensitive enzymes in the pathway of the branched chain amino acids and serine.<br>Colloq. Int. Centre Natl. Rech. Sci. (Paris) 134, 217 - 282. |

| | | |
|---|---|---|
| UMBARGER, H. E. | 1969 | Regulation of amino acid metabolism. Ann. Rev. Biochem. 38, 323 - 369. |
| VALLEE, B. L.<br>WACKER, W. E. C. | 1970 | Metalloproteins. In: The Proteins Bd. V (Hrsg. H. Neurath), Academic Press New York u. London. |
| VESTERBERG, O. | 1972 | Isoelectric focussing of proteins in polyacrylamidgel. Biochim. Biophys. Acta 257, 11 - 19. |
| WALBORSKY, H. M.<br>LANG, J. H. | 1956 | Effects of the trifluormethyl group. IV. The pK's of ω-trifluoro-amino acids. J. Amer. Chem. Soc. 78, 4314 - 4316. |
| WARBURG, O.<br>CHRISTIAN, W. | 1941 | Isolierung und Kristallisation des Gärungsfermentes Enolase. Biochem. Z. 310, 384 - 421. |
| WEBB, A. D.<br>INGRAHAM, J. L. | 1963 | Fusel oil. Adv. Appl. Microbiol. 5, 317 - 353. |
| WEBSTER, R. E.<br>GROSS, S. R. | 1965 | The α-isopropylmalate synthetase of Neurospora. I. The kinetics and endproduct control of α-isopropylmalate synthetase function. Biochemistry 4, 2309 - 2318. |
| WESTERFELD, W. W. | 1945 | A colorimetric determination of blood acetoin. J. Biol. Chem. 161, 495 - 502. |
| WIEGEL, J. | 1974 | Die α-Isopropylmalat-Synthase in Hydrogenomonas eutropha H 16. Diss. Göttingen |

Meinem Lehrer, Herrn Prof. Dr. H. G. Schlegel, danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit, für sein reges Interesse an ihrem Fortgang und für die mir stets gewährte Unterstützung.

Ich danke Herrn Priv. Doz. Dr. G. Wolf für die eingehende Unterweisung in die Methoden der Gelelektrophorese.

Weiterhin danke ich allen, die mir bei der Anfertigung dieser Arbeit in irgendeiner Weise behilflich waren.

LEBENSLAUF

| | |
|---|---|
| 25. 4. 1946 | geboren in Wilhelmshaven |
| Frühjahr 1952 - Frühjahr 1956 | Besuch der Grundschule in Wilhelmshaven |
| Frühjahr 1956 - Frühjahr 1965 | Besuch des mathematisch-naturwissenschaftlichen Gymnasiums Max-Planck-Schule in Wilhelmshaven |
| Februar 1965 | Abitur |
| Mai 1965 | Immatrikulation an der Georg-August-Universität, Göttingen, für das Studienfach Biologie |
| Frühjahr 1967 | Naturwissenschaftliche Zwischenprüfung in Biologie und Chemie |
| Mai 1967 - Januar 1969 | Studium an der Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg/Br. |
| Februar 1969 | Fortsetzung des Studiums an der Georg-August-Universität, Göttingen |
| Juli 1972 | Mündliche Hauptdiplomprüfung mit Mikrobiologie als Hauptfach, physiologischer Chemie und Botanik als Nebenfächer |
| Januar 1973 | Abschluß der experimentellen Diplomarbeit mit dem Titel: „Reinigung der α-Isopropylmalat-Synthase aus Micrococcus denitrificans und enzymkinetische Messungen" |
| Februar 1973 | Beginn der experimentellen Arbeit zur vorliegenden Dissertation |

SOFORTDRUCK BRAUNSCHWEIG

SOFORTDRUCK BRAUNSCHWEIG